

**HOXB4-vermittelte Spezifikation des hämogenen Endothels
während der Differenzierung
pluripotenter Stammzellen, *in vitro***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Nadine Jana Teichweyde
aus Herten
Juli 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Horn

2. Gutachter: Prof.'in Dr. Andrea Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Jürgen Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
1. Einleitung.....	12
1.1. Generierung hämatopoetischer Zellen aus pluripotenten Stammzellen.....	12
1.2. Embryonalentwicklung des adulten hämatopoetischen Systems.....	13
1.3. Zellulärer Ursprung frühester definitiver HSPZ.....	17
1.4. Charakterisierung des hämogenen Endothels	20
1.5. Transkriptionelle Regulationen der Blutbildung.....	21
1.6. Die Rolle von <i>HOX</i> -Genen	25
1.7. Einfluss von <i>HOXB4</i> auf das hämatopoetische System	26
1.8. Zielsetzung.....	28
2. Material und Methoden	30
2.1. Material	30
2.1.1. Technische Ausstattung	30
2.1.2. Verbrauchsmaterial.....	31
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	32
2.1.4. Zelllinien.....	34
2.1.5. Reporter- und <i>knock-out</i> ESZ-Linien	35
2.1.6. Zellkulturmedien und Zusätze.....	35
2.1.7. Puffer und Lösungen	38
2.1.8. Plasmide für die Virusproduktion.....	39
2.1.9. Reagenzsysteme.....	40
2.1.10. Rekombinante Zytokine	41
2.1.11. Antikörper	41
2.1.12. Oligodesoxynukleotide.....	42
2.1.13. Material für Bakterien.....	43
2.1.14. Software	43
2.2. Zellbiologische Methoden	44
2.2.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	44
2.2.1.1. Neubauer-Zählkammer	44

2.2.1.2.	Das Casy® Messprinzip.....	44
2.2.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	45
2.2.3.	Ablösen und Kultivieren adhärenter Zellen.....	46
2.2.3.1.	OP9-Zellen	46
2.2.3.2.	293T-Zellen	46
2.2.3.3.	HT-1080-Zellen.....	47
2.2.4.	Herstellung γ -bestrahlter embryonaler Mausfibroblasten (MEFs).....	47
2.2.5.	Kultivierung embryonaler Stammzellen.....	47
2.2.5.1.	CCE ESZ-Linie.....	47
2.2.5.2.	<i>iRunx1</i> ^{-/-} , <i>Bry</i> ^{GFP/+} , <i>Runx1</i> ^{Venus/+} ESZ.....	48
2.2.6.	Herstellung retroviraler Partikel und Titration.....	49
2.2.6.1.	Kalzium-Phosphat-vermittelte Transfektion von 293T-Zellen.....	49
2.2.6.2.	Titration virushaltiger Zellkulturüberstände auf HT-1080-Zellen.....	50
2.2.7.	Herstellung von 2x Methylcellulose für die EB-Differenzierung	51
2.2.8.	Produktion von konditioniertem D4T-Medium	51
2.2.9.	Herstellung des Leukämie inhibierenden Faktors (LIF) als konditionierter Zellkulturüberstand	51
2.2.10.	Überblick über die hämatopoetische ESZ-Differenzierung.....	52
2.2.11.	Zellseparation mittels MACS.....	53
2.2.11.1.	Entfernung der OP9-Zellen aus der Kokultur mittels MACS.....	53
2.2.12.	Transduktion von ESZ	53
2.2.13.	<i>Embryoid Body</i> -Formation	54
2.2.14.	Hämatopoetische Differenzierung und Bildung von Endothelstrukturen.....	55
2.2.15.	BL-CFC-Assay	55
2.2.16.	<i>In vitro</i> Angiogenese mit Matrigel.....	56
2.2.17.	Hämatopoetischer Koloniebildungsassay (CFC-Assay)	57
2.2.18.	Durchflusszytometrie.....	58
2.2.18.1.	Messung und Zellsortierung.....	59
2.2.18.2.	Ausschluss der OP9-Zellen in durchflusszytometrischen Messungen	60
2.2.19.	Zeitrafferaufnahmen	61
2.2.19.1.	Aufnahme einer CD41 exprimierenden hämatopoetischen Zelle.....	61
2.2.19.2.	Dokumentation der Transition von Endothelzellen zu HSPZ (EHT).....	61
2.2.20.	Direkte Immunfluoreszenzfärbung in der Zellkultur	62
2.2.21.	Färbung von Endothelzellen mit DilAcLDL.....	62

2.3. Molekularbiologische Methoden	62
2.3.1. RNA Isolierung aus Zellen.....	62
2.3.2. cDNA Synthese.....	64
2.3.3. Entwurf von Desoxyoligonukleotid-Primern.....	64
2.3.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)	65
2.3.5. Statistik	67
2.3.6. EDV-Programme/Software	67
3. Ergebnisse	68
3.1. HOXB4 beeinflusst die Entstehung Endothel-ähnlicher Kolonien und expandiert hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen während der Differenzierung embryonaler Stammzellen	68
3.1.1. ESZ-abgeleitete Suspensionszellen exprimieren den frühesten hämatopoetischen Oberflächenmarker CD41	69
3.1.2. Entstehung Endothel-ähnlicher Kolonien.....	71
3.1.3. Die Kolonien exprimieren Endothel-assoziierte Marker	72
3.1.4. HOXB4 erhöht die Anzahl HE-ähnlicher Kolonien.....	73
3.2. Ektop exprimiertes HOXB4 verstärkt nicht die Mesodermspezifikation	75
3.3. HOXB4 beeinflusst die Expression von <i>Runx1</i>	79
3.3.1. Die initiale <i>Runx1</i> Expression ist während der EB-Differenzierung nicht HOXB4 abhängig.....	79
3.3.2. HOXB4 fördert die Entstehung einer Subpopulation mit erhöhter <i>Runx1</i> Expression (<i>Runx1^{hi}</i>)	82
3.3.3. HOXB4 steigert die Expression von <i>Runx1</i> in einer Subpopulation von Zellen die bereits <i>Runx1</i> exprimieren	83
3.4. HOXB4 verstärkt die Entstehung des hämogenen Endothels und beeinflusst die Proliferation von CD41⁺CD45⁺ Zellen synergistisch mit <i>Runx1</i>	86
3.4.1. In <i>iRunx1</i> -Zellen wird durch Zugabe von Doxyzyklin das hämatopoetische Programm initiiert	87
3.4.2. HOXB4 vermittelt eine Expansion des hämogenen Endothels.....	89
3.4.2.1. Eine ektop Expression von HOXB4 führt zur Vermehrung von Zellen, die immunphänotypisch dem HE entsprechen	91
3.4.2.2. Synergistische Aktivität von HOXB4 und <i>Runx1</i> während der Endothel-zu-Hämatopoese Transition.....	93

3.4.2.3. Die Endothelzellen in der Kolonie sind hämogen.....	95
3.5. HOXB4 vermittelt eine Erhöhung der hämogenen Endothelvorläufer	99
3.5.1. Aus klonalen HE-Kolonien-abgeleitete hämatopoetische Zellen besitzen multipotentes und linienspezifisches Koloniebildungspotenzial	101
3.6. HOXB4 beeinflusst die hämatopoetische Differenzierung pluripotenter Stammzellen während des Übergangs vom Hämangioblasten zum hämogenen Endothel.....	103
3.6.1. HOXB4 beeinflusst nicht die Entstehung von Hämangioblasten.....	103
3.6.2. HOXB4 verändert das Hämangioblasten-Potenzial	105
4. Diskussion	107
4.1. Einfluss von HOXB4 in der frühen Phase der Mesodermentwicklung	107
4.2. HOXB4-vermittelte Anreicherung des hämogenen Endothels	110
4.3. Auswirkung von HOXB4 auf die Expression von <i>Runx1</i>	112
4.3.1. Einfluss von Runx1 auf die Weiterentwicklung von CD41 ⁺ Zellen zu HSZ	114
4.4. Wie forciert HOXB4 die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen?.....	114
4.5. Ausblick.....	115
5. Zusammenfassung	117
6. Summary	119
7. Literaturverzeichnis	121
8. Anhang	133
8.1. Plasmidkarten.....	133
Danksagung.....	134
Lebenslauf.....	136
Eidesstattliche Erklärung.....	138

Abkürzungsverzeichnis

AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BL-CFC	<i>Blast-colony forming cell</i>
BV421	Brilliant Violett 421
bzw.	beziehungsweise
CFU	<i>Colony forming cell unit</i>
CFU-E	<i>Colony forming unit-erythrocyte</i>
CFU-G	<i>Colony forming unit-granulocyte</i>
CFU-GM	<i>Colony forming unit-granulocyte-macrophage</i>
CFU-M	<i>Colony forming unit-macrophage</i>
CFU-Mix	<i>Colony forming unit-myeloid-erytroid</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
d	Differenzierungstag
DA	Dorsale Aorta
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
dHSZ	Definitive hämatopoetische Stammzellen
dHSPZ	Definitive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
DiAcLDL	Acetylated Low Density Lipoprotein, labeled with 1,1'-dioctadecyl – 3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DOX	Doxyzyklin
ds	doppelsträngig
E	Embryonaltag
EB	<i>Embryoid body</i>
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EHT	<i>Endothelial-to-hematopoietic transition</i> ; Endothel-zu-Hämatopoese Transition
EMP	<i>Erythro-myeloid-progenitors</i>
ESZ	Embryonale Stammzellen
ESZ-HZ	Hämatopoetische Stammzellen abgeleitet von embryonalen Stammzellen
ESZ-HSPZ	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen abgeleitet von embryonalen Stammzellen
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
Flt3L	Flt3-Ligand
FSC	<i>Forward scatter</i>
HA	Hämagglutinin-Markierung
HE	Hämogenes Endothel
HOXB4	Homöoboxgen B4
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
HSPZ	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
HZ	Hämatopoetische Zellen
IL	Interleukin
L-Gln	L-Glutamin
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LTR	<i>Long terminal repeat</i>

MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MTG	Monothioglycerol
NTC	<i>No-Template Control</i>
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
pA	Polyadenylierungssignal
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyllprotein-Cyanin5.5
PMT	<i>Photomultiplier tubes</i>
P-S	Penicillin/Steptomycin
RA	Reanalyse
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
rtTA	<i>Reverser tetracycline-controlled transactivator</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Std.	Stunde
STFV-Medium	SCF, TPO, Flt3L, VEGF
TF	Transkriptionsfaktor
TPO	Thrombopoietin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VE-cad	<i>Vascular endothelial-cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
wPRE	<i>Woodchuck post transcriptional regulatory element</i>
YS	<i>Yolk sac</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Hämatopoese in der Maus und im Menschen.....	14
Abb. 2: Unterscheidung primitiver und definitiver Hämatopoese	15
Abb. 3: Entstehung hämatopoetischer Cluster in der dorsalen Aorta diverser Vertebraten...	16
Abb. 4: Modell zur HSZ Spezifikation während der ESZ-Differenzierung	18
Abb. 5: Hämogenes Endothel am Boden der dorsalen Aorta	19
Abb. 6: Zeitverlauf von der Entstehung adulter HSZ.....	24
Abb. 7: HOX-Cluster Anordnung	25
Abb. 8: Reporter- und <i>knock-out</i> ESZ-Linien.....	35
Abb. 9: Schematischer Überblick des γ -retroviralen HOXB4 Expressionsvektors	39
Abb. 10: Casyblue Evaluation mittels Casy	45
Abb. 11: Experimenteller Aufbau.....	52
Abb. 12: Beispiel-Aufnahme einer Blast-Kolonie und sekundären EB-Kolonie.....	56
Abb. 13: Ausschluss der OP9-Zellen.....	61
Abb. 14: Endothelkolonien und hämatopoetische Zellcluster treten gemeinschaftlich auf	69
Abb. 15: Entstehung von CD41 ⁺ Zellen aus ESZ.....	70
Abb. 16: Expression von CD41 in HOXB4 ⁺ Zellen	71
Abb. 17: Morphologie endothelialer Kolonien.....	72
Abb. 18: Charakterisierung der Kolonien als Endothelium	73
Abb. 19: Quantifizierung und prozentualer Anteil von Endothelstrukturen während der Kokultivierung mit OP9-Zellen.....	74
Abb. 20: Zeitverlauf der <i>Brachyury</i> Expression während der EB-Differenzierung	77
Abb. 21: Entstehung CD41 ⁺ CD45 ⁺ Zellen aus <i>Brachyury</i> ^{GFP/+} ESZ-HSPZ.....	78
Abb. 22: Transduktion von <i>Runx1</i> ^{Venus/+} ESZ	80
Abb. 23: Expressionsverlauf von <i>Runx1</i> und <i>Flk1</i> während der EB-Differenzierung	80
Abb. 24: Relative Transkriptmengen von <i>Gata2</i> und <i>Scl/tal1</i>	81
Abb. 25: Anzahl der Suspensionscluster auf OP9-Zellen	82
Abb. 26: HOXB4-vermittelte Entstehung einer <i>Runx1</i> ^{hi} Subpopulation.....	82
Abb. 27: Durchflusszytometrische Analyse des hämatopoetischen Potenzials <i>Runx1</i> ^{neg} - und <i>Runx1</i> ^{pos} sortierter Subpopulationen.....	85
Abb. 28: Regulierbarkeit der <i>iRunx1</i> -ESZ während der hämatopoetischen Differenzierung .	86

Abb. 29: Serumtest und Titration von Doxyzyklin.....	87
Abb. 30: Überprüfung der Doxyzyklin-abhängigen Induzierbarkeit von <i>Runx1</i>	88
Abb. 31: FMEV transduzierte <i>iRunx1</i> -ESZ für die EB-Differenzierung.....	90
Abb. 32: Anzahl von <i>bona fide</i> HE-Kolonien +/- HOXB4 Modulation	90
Abb. 33: Koexpression HE-assoziiierter Oberflächenmarker	91
Abb. 34: Relative Transkriptmengen von <i>Sox17</i> und <i>Lmo2</i> in <i>iRunx1</i> -Zellen	92
Abb. 35: Synergistische Aktivität von HOXB4 und Runx1 bei der Entstehung von hämatopoetischen Zellen.....	94
Abb. 36: Zeitrafferaufnahmen von der Umwandlung des hämogenen Endothels in HSPZ...	95
Abb. 37: Charakterisierung der Expressionshöhe von HOXB4 und der Entstehung HOXB4 ⁺ CD41 ⁺ bzw. HOXB4 ⁺ Runx1 ⁺ Zellen	97
Abb. 38: Expressionsanalyse der Runx1 Zielgene: <i>Gfi1</i> , <i>Gfi1b</i> , <i>Sfp1</i>	98
Abb. 39: Einzelzellablagen von <i>iRunx1</i> Tag 6 EBs	99
Abb. 40: Frequenzbestimmung des HE-Vorläufers aus Tag 6 EB Einzelzellablagen	100
Abb. 41: Entstehung CD41 ⁺ CD45 ⁺ und CD41 ⁻ CD45 ⁺ Suspensionszellen aus einem HE- Progenitor Klon.....	101
Abb. 42: Charakterisierung hämatopoetischer Kolonien im CFC-Assay	102
Abb. 43: Schema des BL-CFC-Assays	103
Abb. 44: Anreicherung Flk1 ⁺ Zellen für den BL-CFC-Assay	104
Abb. 45: Bestimmung des Hämangioblastenpotenzials.....	105
Abb. 46: Quantifizierung von HE-Kolonien und Charakterisierung der Ausbildung tubulärer Strukturen im Matrigel	106
Abb. 47: Modell zum Einfluss von HOXB4 auf die hämatopoetische Differenzierung.	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	34
Tabelle 2: Verwendete Basalmedien	35
Tabelle 3: Verwendete Medienzusätze	36
Tabelle 4: Verwendete Zytokine.....	41
Tabelle 5: Konjugierte Antikörper.....	41
Tabelle 6: Sequenzen mausspezifischer Primer für die qRT-PCR.....	42
Tabelle 7: Primer für die qRT-PCR bezogen von Qiagen	42
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR für 40 Zyklen	65
Tabelle 9: Gesamtzellzahl <i>Bry</i> ⁺ Zellen.....	77
Tabelle 10: Gesamtzellzahl von Venus(<i>Runx1</i>) ⁺ Zellen.....	83
Tabelle 11: Eingesetzte Zellzahl Venus ^{+/-} Tag 6 EBs.....	84

1. Einleitung

Blut ist eines der stärksten regenerativen Gewebe. Täglich wird eine große Menge an Blutzellen benötigt, die stetig neu gebildet werden müssen (Hämatopoese). Dafür verantwortlich sind die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ), die im adulten Organismus im Knochenmark angesiedelt sind. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sind die zentralen Organisatoren des hierarchischen Blutbildungsprozesses. Sie haben sowohl die Fähigkeit sich selbst zu erneuern, als auch in alle hämatopoetischen Zelllinien zu differenzieren, um so die Zahl der Blutzellen ein Leben lang konstant aufrecht zu erhalten (Homöostase). Dies und das Potenzial der Rekonstitution der Hämatopoese nach Stammzelltransplantation macht die HSZ zu einem wesentlichen Ziel für die Zell- und Gentherapie. Voraussetzung dafür ist eine gezielte Isolation der HSZ mit anschließender Genkorrektur und Expansion molekular definierter „sicherer“ HSZ-Klone. In diesem Punkt gibt es aber noch einige Hürden zu überwinden. HSZ sind nur in geringer Zahl vorhanden und können bisher *in vitro* nicht vermehrt werden. Eine attraktive Alternative bietet die *in vitro* Herstellung von HSZ aus pluripotenten Stammzellen (PSZ).

1.1. Generierung hämatopoetischer Zellen aus pluripotenten Stammzellen

Das Potenzial embryonaler Stammzellen jeden Zelltyp des erwachsenen Menschen nachbilden zu können, hat diese Zellen seit 1981, nach erfolgreicher Isolierung aus der Maus [Evans and Kaufman 1981] und später auch aus humanen Blastozysten [Thomson *et al.* 1998], immer mehr in den Mittelpunkt der Gen- und Zelltherapie gesetzt. Insbesondere seit 2006 [Takahashi and Yamanaka 2006], als japanische Forscher herausgefunden haben, wie man somatische Zellen in den pluripotenten Zustand zurückversetzt, sind solche „induzierten pluripotenten Stammzellen“ (iPSZ) eine ideale Voraussetzung für die Generierung patientenspezifischer Stammzellen, wie zum Beispiel den HSPZ. Pluripotente Zellen können unter geeigneten

Bedingungen in der Kultur unbegrenzt vermehrt werden und haben darüber hinaus die Fähigkeit in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm). Durch gezielte Genkorrektur und Differenzierung könnten so autologe, gesunde, blutbildende Stammzellen und reife Effektorzellen *in vitro* hergestellt werden. Die genetische Korrektur patientenspezifischer Stammzellen würde somit die Komplikationen einer Graft-versus-Host Reaktion (GvHR) nach allogener Transplantation eliminieren. Die *in vitro* Generierung humaner HSZ für die Klinik ist aber bis dato noch nicht möglich und bedarf weiterer Forschung, um eine erfolgreiche Differenzierung und Expansion von HSZ aus humanen iPSZ gewährleisten zu können.

1.2. Embryonalentwicklung des adulten hämatopoetischen Systems

Durch das Potenzial embryonaler Stammzellen in alle Zellen des menschlichen Körpers zu differenzieren, kann man mit Hilfe der ESZ-Differenzierung, *in vitro*, die Embryonalentwicklung rekapitulieren und somit unterstützende Faktoren, die zur hämatopoetischen Spezifikation beitragen, näher untersuchen [Keller 2005]. Ein verbessertes Verständnis über die wesentlichen extrinsischen und intrinsischen Signalwege während der embryonalen Hämatopoese sind entscheidend für die *de novo* Herstellung von HSZ, *in vitro*. Abb. 1 zeigt den zeitlichen Verlauf und wesentliche Eckpunkte der embryonalen Hämatopoese in der Maus und im Menschen. Der initiale Schritt der hämatopoetischen Spezifikation beginnt mit der Mesodermentstehung. Das Mesoderm bildet sich während der Gastrulation, wenn Epiblastzellen mesenchymal werden und durch den Primitiv Streifen migrieren und über die Expression des T-Box Gens *Brachyury* (*Bry*) detektiert werden können. Die Expression von *Bry* markiert das neu entstehende Mesoderm und wird runter reguliert, wenn die Zellen in Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Bindegewebe, Blutgefäße und Blut weiter differenzieren [Herrmann 1991, Kispert and Herrmann 1994]. Die ersten Blutinseln findet man im Dottersack und später entstehen hämatopoetische Cluster in den großen embryonalen Gefäßen. Anschließend

verlagert sich die Hämatopoese in die Leber, bis die HSZ schließlich nach der Geburt das Knochenmark kolonisieren (Übersicht: [Baron *et al.* 2012, Golub and Cumano 2013]. Das Maussystem hat neben dem Zebrafisch-, Krallenfrosch- und Vogel-Modell entscheidend zum heutigen Wissen über die Entstehung von hämatopoetischen Zellen (HZ) beigetragen. Transplantationsversuche und die Entwicklung humanisierter Mausmodelle und transgener Tiere hat die Maus als Modellsystem weiter bestätigt und bis heute unentbehrlich gemacht. In dieser Arbeit wird hauptsächlich auf die Embryonalentwicklung und die damit verbundene hämatopoetische Spezifikation in differenzierenden Maus ESZ eingegangen.

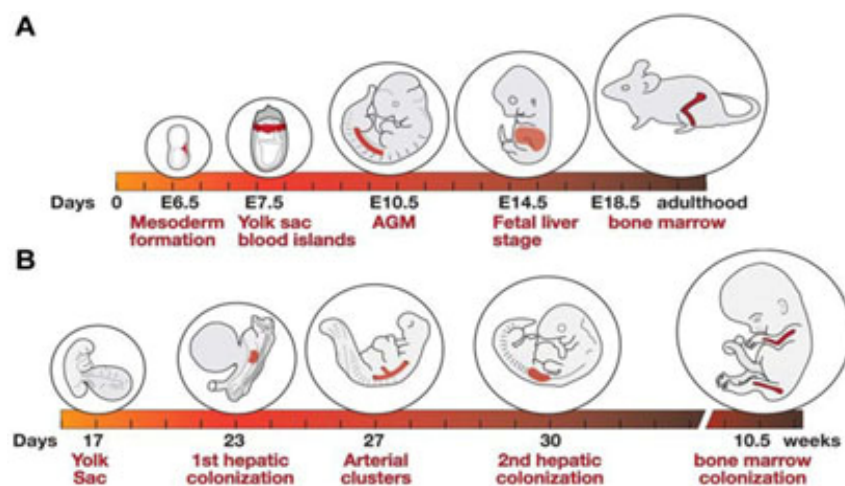


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Hämatopoese in der Maus und im Menschen

(A) Hämatopoetische Entwicklung in der Maus und (B) im Menschen. Abk.: AGM: Aorta-gonad-mesonephros; Aorta-Gonaden-Mesonephros. [Baron *et al.* 2012]

Adulte HSZ sind die bisher am besten charakterisierten Gewebe-spezifischen Stammzellen. Sie besitzen die Fähigkeit alle reifen Blutzelllinien (erythroid, myeloisch, lymphatisch) ein Leben lang zu erneuern. Aus diesem Grund können sie nach Knochenmarktransplantation die Hämatopoese neu rekonstituieren. Wie in Abb. 2 übersichtlich dargestellt, kann man während der Embryogenese an verschiedenen anatomischen Stellen hämatopoetisches Potenzial finden (Übersicht: [Dzierzak and Speck 2008, Medvinsky *et al.* 2011, Costa *et al.* 2012]). Dazu gehört der extraembryonale Dottersack, die Nabel- und Vitellin-Arterie, die Plazenta, die

embryonale Aorta [Zovein *et al.* 2008], die Kopfgefäße [Li *et al.* 2012] und das Endothel im Herzen [Nakano *et al.* 2013] (Abb. 2B). In der Leber findet keine *de novo* Hämatopoese statt. Das Organ dient zur Kolonisierung zirkulierender Stammzellen (Maus: Embryonaltag (E) 10), wo bis zur Geburt eine Weiterreifung und Expansion erfolgt, bevor die Zellen ins Knochenmark wandern [Johnson and Moore 1975, Takeuchi *et al.* 2002, Kieusseian *et al.* 2012]. Die Entstehung von HZ während der Embryonalentwicklung erfolgt asynchron und kann in sich überlappende Wellen unterteilt werden (Abb. 2A; [Swiers *et al.* 2013b]). Man unterscheidet die frühe embryonale, „primitive“ Hämatopoese und die sich anschließende permanente, „definitive“ Hämatopoese. Im Mausembryo entstehen die ersten hämatopoetischen Zellen (E7,5) in den extraembryonalen Blutinseln des Dottersacks, hauptsächlich bestehend aus primitiven Erythrozyten, die den Embryo mit Sauerstoff versorgen, Megakaryozyten und Makrophagen [Palis *et al.* 1999, Palis and Yoder 2001, Tober *et al.* 2007]. Kurz danach beginnt im Dottersack die transiente 2. Welle (E8/8,5) mit multipotenten und auf bestimmte Linien beschränkten Blutzellen, den erythro-myeloiden-Progenitoren (EMPs).

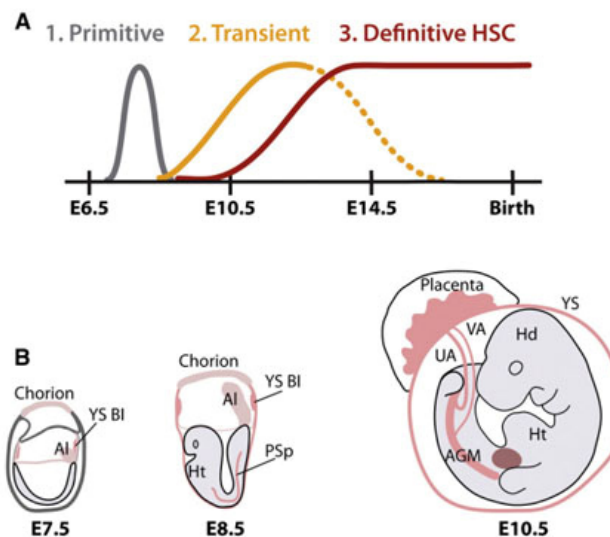


Abb. 2: Unterscheidung primitiver und definitiver Hämatopoese

(A) Zeitliche Einteilung der Entstehung von hämatopoetischen Zellen im Mausembryo in drei sich überlappende Wellen. Man unterscheidet die primitive, transiente und definitive Hämatopoese. (B) Schematische Darstellung eines Mausembryos zu Zeitpunkten, die entscheidend sind für die Blutbildung. Abk.: YS: Yolk sac, BI: Blood islands, Al: Allantois, PSp: Para-aortic splanchnopleura, Ht: heart endothelium, AGM: Aorta-gonad-mesonephros, Hd: Head vasculature, VA: vitelline artery, UA: Umbilical artery. [Swiers *et al.* 2013b]

Die definitive Hämatopoese beginnt ab E10,5 und leitet die 3. Welle der Entstehung von hämatopoetischen Zellen im Embryo ein. Sie ist charakteristisch für die Generierung der adulten HSZ mit Langzeit-Repopulationspotenzial. Definitive HSZ (dHSZ) entstehen aus Derivaten des Seitenplattenmesoderms [Baron 2005]. 1975 hat Dieterlen-Lièvre mit Hilfe von Wachtel-Küken-Chimären herausgefunden, dass die adulten HSZ im Embryo entstehen müssen [Dieterlen-Lievre 1975]. Weitere Untersuchungen im Vogelembryo haben gezeigt, dass hämatopoetische Prozesse im Mesoderm zu finden sind, und dass der ventrale Boden der dorsalen Aorta (DA) womöglich die Quelle ist [Dieterlen-Lievre and Martin 1981]. Im Mausembryo am E10,5 konnte schließlich gezeigt werden, dass die DA in der AGM-Region der Ort der frühesten definitiven Hämatopoese ist [Medvinsky *et al.* 1993, Muller *et al.* 1994, Medvinsky and Dzierzak 1996]. Die Bildung der hämatopoetischen Cluster am Boden der DA ist evolutionär konserviert und kann unter anderem im Küken, Schwein, Maus und Menschen gefunden werden (Abb. 3).

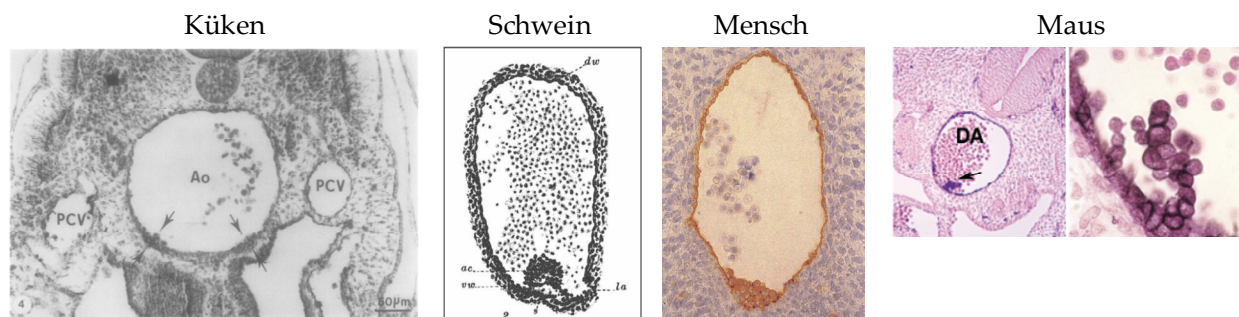


Abb. 3: Entstehung hämatopoetischer Cluster in der dorsalen Aorta diverser Vertebraten

Dargestellt ist die Bildung der hämatopoetischen Cluster, die am ventralen Boden der DA im Küken (3 Tage alt), Schwein (12 mm Embryo), Mensch (Tag 35) und der Maus (Tag 10) entstehen [Emmel 1915, Dieterlen-Lievre and Martin 1981, Tavian *et al.* 1996, Urness *et al.* 2000].

Die Einleitung der definitiven Hämatopoese im Embryo wird mit der Entstehung eines spezialisierten Endothels in Verbindung gebracht und wird in den nächsten Abschnitten detailliert beschrieben.

1.3. Zellulärer Ursprung frühester definitiver HSPZ

Aufgrund der gleichen räumlich-zeitlichen Entstehung von Blut- und Endothelzellen in den Blutinseln des extraembryonalen Dottersacks, hat man bereits früh angenommen, dass beide Zelltypen von einem gemeinsamen mesodermalen Progenitor abstammen, dem sogenannten Hämangioblasten, der im Primitivstreifen während der Gastrulation spezifiziert wird [Huber *et al.* 2004]. Der Begriff des Hämangioblasten wurde 1932 erstmals von Murray geprägt, um das spezifische Potenzial eines Angioblasten hervorzuheben, der zur Entstehung von Blut und Endothelzellen beiträgt [Murray 1932]. Durch Experimente an ESZ konnte die Existenz des Hämangioblasten weiter unterstützt werden. Maus ESZ können in Abwesenheit des Leukämie inhibierenden Faktors (LIF) spontan differenzieren und bilden *in vitro* zystische dreidimensionale Strukturen, sogenannte „Embryoid Bodies“ (EBs), die zu einem bestimmten Maße die embryonale Entwicklung eines Organismus nachahmen [Doetschman *et al.* 1985]. Spezielle Kulturbedingungen und „Zytokincocktails“ wurden entwickelt, um die hämatopoetische Differenzierung von ESZ *in vitro* zu induzieren und das Überleben und die Selbsterneuerungskapazität von HSPZ zu gewährleisten. Das Nachahmen der natürlichen Umgebung von HSZ, der Stammzellnische, hat sich als besonders vorteilhaft für den Erhalt hämatopoetischer Zellen *in vitro* erwiesen. Dafür wurden aus verschiedenen hämatopoetischen Stammzellnischen wie Dottersack [Yoder *et al.* 1994], AGM [Nishikawa *et al.* 2001], fetale Leber [Moore *et al.* 1997] und Knochenmark [Nakano *et al.* 1994] Stromazellen etabliert, die in der Kokultur den Erhalt und Expansion von HSPZ erlauben. OP9-Zellen, die aus der Schädelkalotte einer osteopetrotischen Maus (op/op) isoliert wurden, werden häufig als Stromazellen für die Kokultivierung von ESZ verwendet, weil sie die hämatopoetische Differenzierung in alle Blutzelllinien unterstützen [Nakano *et al.* 1994, Nakano *et al.* 1996]. Das ESZ-Differenzierungssystem eignet sich deshalb besonders gut, um den zellulären Ursprung frühester HSZ im Detail zu untersuchen. Keller *et al.* zeigten, dass die ESZ

in vitro zu Mesoderm und hämatopoetischen Zellen differenzieren können, und dass sowohl das Genexpressionsmuster, als auch die Differenzierungskinetik im Embryo ähnlich verläuft [Keller *et al.* 1993]. Die Expression des T-Box Gens *Brachyury* markiert die Entstehung des Mesoderms im Embryo [Herrmann 1991], aus dem die ersten hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen hervorgehen [Moore and Metcalf 1970]. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass in frühen EBs auch Vorläufer (Progenitoren) mit Hämangioblasten Potenzial existieren, die in Anwesenheit des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) Blast-Kolonien bilden. Diese Blast-Kolonie-formende Zelle (BL-CFC) ist transient während der EB-Differenzierung vorhanden und hat sowohl hämatopoetisches, als auch endotheliales Potenzial und ist das *in vitro* Pendant zum Hämangioblasten [Choi *et al.* 1998] (Abb. 4).

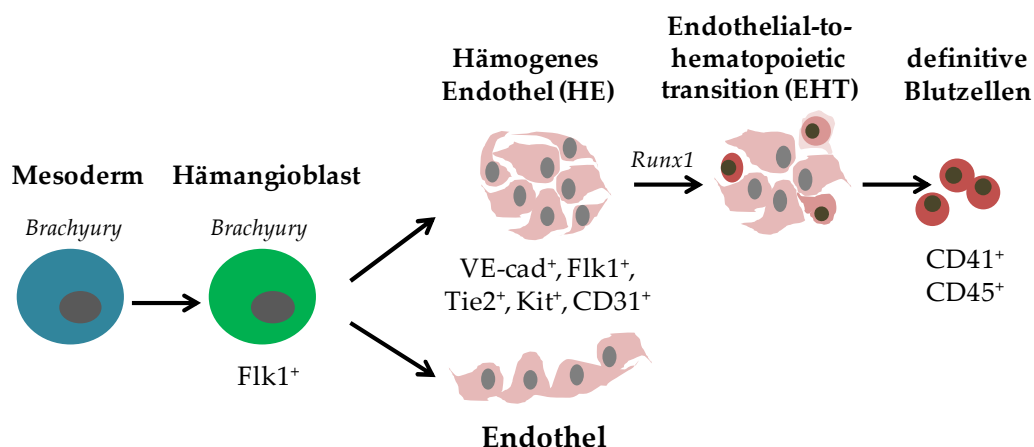


Abb. 4: Modell zur HSZ Spezifikation während der ESZ-Differenzierung

Dargestellt ist die Entstehung hämatopoetischer Zellen aus dem viszeralem Mesoderm über die Zwischenstufen des Hämangioblasten und hämogenen Endothels (HE) bis hin zu den ersten hämatopoetischen *CD41*⁺/*CD45*⁺ Zellen. Für die Charakterisierung der einzelnen Zwischenstufen wurden Zelloberflächenmarker (*VE-cad*, *Flk1*, *Tie2*, *Kit*, *CD31*, *CD41*, *CD45*) und Transkriptionsfaktoren (*Brachyury*, *Runx1*) aufgeführt (modifiziert nach [Lancrin *et al.* 2010]).

Auch die Bildung glatter Muskelzellen wurde dem Hämangioblasten *in vitro* und *in vivo* zugesprochen [Ema *et al.* 2003, Huber *et al.* 2004]. Außerdem konnte sowohl im Embryo, als auch in EB-abgeleiteten BL-CFCs demonstriert werden, dass der Hämangioblast eine Subpopulation des Mesoderms darstellt, der *Bry* und *Flk1* (*Kdr*,

VEGF-Rezeptor2) koexprimiert [Fehling *et al.* 2003, Huber *et al.* 2004]. Die Vorstellung eines bipotenten Vorläufers konnte durch histologische Untersuchungen von hämatopoetischen Zellen in der DA im Embryo, die im Verbund in engem Kontakt mit der Gefäßwand stehen, gestärkt werden. Phänotypische und funktionelle Analysen haben schließlich das Konzept eines spezialisierten Endothels, des sogenannten hämogenen Endothels (HE), das dHSZ hervorbringt, weiter in den Vordergrund gerückt [Jaffredo *et al.* 1998, Nishikawa *et al.* 1998b]. 2009 haben Lancrin *et al.* gezeigt, dass die Entstehung der HSZ vom Hämangioblasten über die Zwischenstufe des HEs verläuft (siehe Abb. 4; [Lancrin *et al.* 2009]). Das HE, wie in Abb. 5 schematisch dargestellt, ist ein transient vorhandenes spezialisiertes Endothel, das unter anderem am ventralen Boden der DA zu finden ist und aus dem die dHSZ heraus knospen. Durch Zeitrafferaufnahmen konnte die Existenz des HEs bewiesen werden.

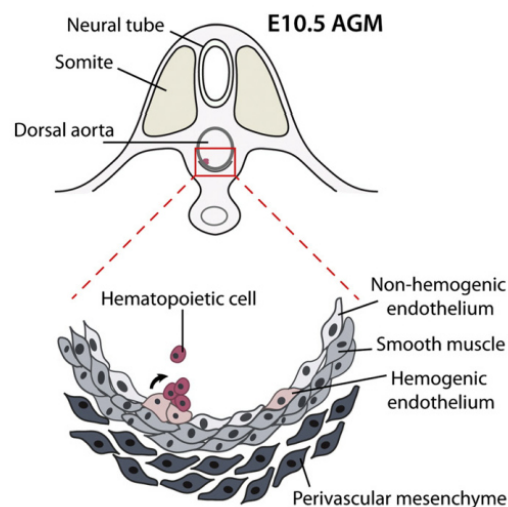


Abb. 5: Hämogenes Endothel am Boden der dorsalen Aorta

Ein Ausschnitt der DA in der AGM Region verdeutlicht die Existenz eines hämogenen Endothels (HE) am ventralen Boden des Gefäßes. Das HE, hier in rosa dargestellt, ist umgeben von strukturellem Endothel (weiß). Definitive HSZ (rot) knospen aus dem HE heraus und bilden Zellcluster [Swiers *et al.* 2013b].

In vitro konnten Eilken *et al.* in Echtzeit die Umwandlung von Endothelzellen in hämatopoetische Zellen mit Hilfe von ESZ-abgeleiteten Zellen visualisieren. Die adhärennten Zellen verloren langsam ihren Endothelcharakter, erhielten eine für

Suspensionszellen typische runde Form und exprimierten Hämatopoese-spezifische Zelloberflächenproteine wie CD41 (Integrin $\alpha 2b$, Itga2b) und CD45 (Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ C, Ptpcr) [Eilken *et al.* 2009]. Diese Transition von Endothel zu Hämatopoese bezeichnet man als *Endothelial-to-hematopoietic transition* (EHT; Endothel-zu-Hämatopese Transition) [Kissa and Herbomel 2010]. Mittels Zeitraffer-konfokaler Mikroskopie und Zellreihen-typischer Markierung von HE-Zellen konnte auch *in vivo* im Maus- und Zebrafisch-Modell der Übergang vom HE zu Blut dokumentiert werden [Bertrand *et al.* 2010, Boisset *et al.* 2010].

1.4. Charakterisierung des hämogenen Endothels

Das HE ist eine seltene, spezielle, nur temporär existierende Population von Endothelzellen, die in HSZ differenzieren können. Nur an bestimmten anatomischen Stellen im Embryo findet man eine kleine Anzahl an Endothelzellen, die hämogen sind, darunter die DA in der AGM-Region, wo ab E10,5 in der Maus die ersten dHSZ entstehen. Etwa zu der Zeit, wenn die dHSZ in der AGM-Region entstehen, können auch HSZ in der Plazenta [Gekas *et al.* 2005, Mikkola *et al.* 2005, Ottersbach and Dzierzak 2005], Dottersack [Muller *et al.* 1994, Kumaravelu *et al.* 2002], Nabel- und Vitellin-Arterie [de Bruijn *et al.* 2000] und in den Kopfgefäßen [Li *et al.* 2012] detektiert werden. Für die Identifikation des HEs wird unter anderem die Expression von Oberflächenantigenen verwendet, die sowohl auf Endothel- als auch auf HE-Zellen nachweisbar sind. Dazu gehört die Expression von *Platelet endothelial cell adhesion moleküle* (PECAM-1, CD31), Flk1 (VEGF Rezeptor-2, KDR, CD309), CD34, VE-cadherin (*vascular endothelial cadherin* VE-cad, CD144; Zelladhäsionsmolekül beschränkt auf Endothelzellen), das Metabolisieren von acetyliertem-LDL [Nishikawa *et al.* 1998a, Nishikawa *et al.* 1998b] als auch der Nachweis der Rezeptor-Tyrosinkinasen Kit (Stammzellfaktor-Rezeptor, CD117) und Tie2 (Angiopoetin-1,2-Rezeptor, Tek; CD202) [Lancrin *et al.* 2009]. Neben der phänotypischen Charakterisierung weisen Flk1⁺ Endothelzellprogenitoren mit hämogenen Potenzial in OP9 Kokulturen auch eine typisch plattenartige Struktur auf [Hirashima *et al.*

1999, Eilken *et al.* 2009]. Die Expression der Rezeptortyrosinkinase Flk1 hat sich als entscheidender Marker für den Nachweis früher endothelialer und hämatopoetischer Progenitoren herausgestellt. Mausembryonen, die homozygot für eine Flk1 Mutation sind, haben einen kompletten Verlust der Endothel- und Hämatopoese-Differenzierung und sterben zwischen E8,5 und E9,5 [Shalaby *et al.* 1995]. Für die Spezifikation des HEs spielt auch der Hedgehog (Hh) und Notch Signalweg eine entscheidende Rolle. Kim *et al.* haben gezeigt, dass die Signalwege von Hh und Notch für die Bildung des HEs wichtig sind, aber nicht mehr danach, da eine Inhibition beider Signalwege nach HE-Formation keinen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von hämatopoetischen Zellen hat [Kim *et al.* 2013]. Einen weiteren wichtigen Schritt zur Charakterisierung des HEs haben Analysen vom Schicksal einzelner Zellen geliefert. Die Arbeitsgruppe um M. de Bruijn konnte auf klonaler Ebene zeigen, dass Endothelzellen früh die Kompetenz zur hämatopoetischen Differenzierung erhalten und damit das endotheliale Potenzial verloren geht [Swiers *et al.* 2013a].

1.5. Transkriptionelle Regulationen der Blutbildung

Für die Spezifikation in Richtung Hämatopoese ist die Anwesenheit und Aktivität von bestimmten Transkriptionsfaktoren (TF) essentiell. Sie regulieren den molekularen Prozess der Differenzierung an bestimmten Eckpunkten während der Entstehung von HSZ und fungieren im Zusammenspiel als Schlüsselregulatoren für die Schicksalsentscheidung einer Zelle. Analysen zum Funktionsverlust und Funktionsgewinn einzelner TF haben den Einfluss der transkriptionellen Regulation auf epigenetische Veränderungen im Chromatin und cis-interagierenden Elementen (Promotor, Enhancer) während der Embryonalentwicklung verdeutlicht. Neben der Identifikation von TF, helfen DNA-Bindungsstudien, Genexpressionsanalysen und Protein-Interaktionsstudien ein TF-Netzwerk Computer-unterstützt zu modellieren. Im Folgenden wird auf einige essentielle TF während der Hämatopoese näher eingegangen. Das *Stem cell leukemia (Scl/Tal-1)* Gen codiert für einen Helix-Loop-

Helix TF, dessen Aktivität besonders früh für die hämatopoetische Spezifikation entscheidend ist. Die Expression des TFs konnte im Vogel-Modell in einer Subpopulation des viszeralen Mesoderms nachgewiesen werden, aus dem die Endothel- und hämatopoetischen Zellen hervorgehen [Drake *et al.* 1997]. Mittels *in situ* Hybridisierungen konnte die *Scl* Expression unter anderem auch in der Leber, in Endothelzellen und hämatopoetischen Clustern der DA gezeigt werden [Pimanda *et al.* 2007]. Der Verlust des TFs in *Scl*^{-/-} Mäusen ist letal wobei die Embryonen ungefähr ab E9,5 an einer Anämie sterben. *In vitro* und *in vivo* konnte entsprechend gezeigt werden, dass eine homozygote *Scl* Mutation (*Scl*^{-/-}) zum Block primitiver und definitiver Hämatopoese führt [Robb *et al.* 1995, Shivdasani *et al.* 1995, Porcher *et al.* 1996, Robb *et al.* 1996]. Mit Hilfe der ESZ-Differenzierung konnte der Zeitpunkt der *Scl* Aktivität definiert und in das Hämatopoesemodell eingegliedert werden [Lancrin *et al.* 2010]. *Scl* ist unverzichtbar für die Entwicklung des HEs. Der TF verleiht den Zellen sehr früh die Kompetenz dafür hämatopoetische Entwicklungsschritte durchlaufen zu können [Endoh *et al.* 2002] und ist essentiell für die Bildung einer Tie2^{hi}Kit⁺CD41⁻ HE-Population [Lancrin *et al.* 2009]. Zusammen mit Gata2 und dem ETS (*E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain*) Faktor Fli1 bildet *Scl* einen Komplex aus TF, die sich gegenseitig transkriptionell regulieren [Pimanda *et al.* 2007]. Diese Arbeitsgruppe zeigte außerdem neben der *Scl* Expression auch eine *Gata2* Expression in der DA an E11,5, wo die dHSZ ihren Ursprung haben. **Gata2** ist ein Zink Finger TF und essentiell für die frühe Hämatopoese. *Gata2*^{-/-} defiziente Maus-Embryonen sterben zwischen Tag E10-11 [Tsai *et al.* 1994]. *Gata/Fli1/Scl* bilden ein regulatorisches Netzwerk für die hämatopoetische Spezifikation. Notch1 reguliert außerdem *Gata2* transkriptionell hoch. Notch1 und *Gata2* werden in den Endothelzellen, die den ventralen Boden der DA auskleiden, koexprimiert und Notch1 ist ein vorgeschalteter Regulator von *Gata2* und bindet an dessen Promotor [Robert-Moreno *et al.* 2005]. Die Entwicklung definitiver hämatopoetischer Zellen aus dem HE ist vom Notch1-Signalweg abhängig [Kumano *et al.* 2003]. Das *Lim domain only 2 (Lmo2)* Gen codiert für einen transkriptionellen Kofaktor, von dem die Interaktion mit sechs

weiteren TF (Scl, Lyl1, Lmo2, Gata2, Runx1, Erg, Fli1) in hämatopoetischen Progenitorzellen gezeigt worden ist. Sie bilden eine kombinatorische transkriptionelle Kontrolle und regulieren die HSPZ-Funktion [Wilson *et al.* 2010]. Die Expression des TF **Sox17** markiert und reguliert die Entwicklung des HEs und wird für die Entstehung der dHSZ benötigt, wie die Arbeitsgruppen von Nancy A. Speck und Gordon Keller *in vitro* und *in vivo* zeigen konnten [Clarke *et al.* 2013]. Sie konnten außerdem demonstrieren, dass Sox17 auch die Expression von Notch1 reguliert. *Sox17*, *Scl/Tal1* und *Lmo2* werden auch eine wichtige Funktion bei der Hämangioblastenspezifikation und Differenzierung zugesprochen [Gering *et al.* 2003, Patterson *et al.* 2007, Vereide *et al.* 2014]. Für die Transition von HE-Zellen zu den dHSPZ (EHT) ist die Expression des *Runx-related transcription factors 1 (Runx1, AML1, Cbfa2)* unabdingbar [Lancrin *et al.* 2009]. Runx1 ist ein DNA-bindendes Protein, das zur Familie der Core Binding Faktor- α (CBF α) TF gehört und mit der nicht DNA-bindenden β -Untereinheit CBF β einen heterodimeren Komplex eingeht. Alle HSZ in den großen extraembryonalen Gefäßen, in der AGM-Region und in der fetalen Leber, die Langzeitrepopulationspotenzial aufweisen, exprimieren *Runx1* [North *et al.* 2002]. *Runx1*^{-/-} Mäuse sterben zwischen E11,5 und 12,5 an Blutungen im ZNS [Wang *et al.* 1996], weil der Verlust von Runx1 zur kompletten Blockade der definitiven Hämatopoese führt, und zwar in allen hämatopoetischen Stellen im Mausembryo (Dottersack, die großen extraembryonalen Gefäße, AGM-Region, Plazenta, fetale Leber, Thymus). Demgegenüber ist Runx1 aber nicht nötig für den Beginn der primitiven Erythropoese im Dottersack [Swiers *et al.* 2010]. Außerdem zeigt sich ein eindeutiger Effekt in der Dosisabhängigkeit dieses TF. Eine *Runx1* Haploinsuffizienz äußert sich in einer geringeren Anzahl hämatopoetischer Cluster und dHSPZ [Wang *et al.* 1996, Cai *et al.* 2000, Mukoyama *et al.* 2000]. Runx1 markiert entsprechend den Beginn der definitiven Hämatopoese. Im Verlauf der EHT kommt es zum Verlust von Endothelmarkern und beginnender Expression von CD41, dem frühesten hämatopoetischen Marker in der Maus [Mikkola *et al.* 2003], und anschließendem Nachweis des Pan-Leukozytenmarkers CD45 auf der

Zelloberfläche [Eilken *et al.* 2009, Lancrin *et al.* 2009]. Während der Embryonalentwicklung wird CD45 erst auf der Zelloberfläche von HSZ detektiert, wenn die Zellen das späte AGM und fötale Leber Stadium erreicht haben [North *et al.* 2002]. Das entspricht dem Zeitpunkt, wenn die ersten dHSZ entstehen. Die Zellen durchlaufen einen stufenweisen Reifungsprozess (Abb. 6).

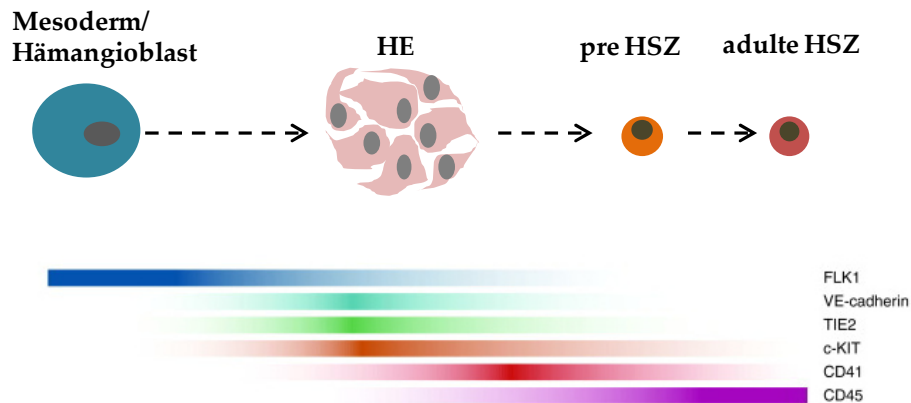


Abb. 6: Zeitverlauf von der Entstehung adulter HSZ

Aufgeführt sind die wichtigen embryonalen Entwicklungsschritte die zur Entstehung adulter HSZ beitragen (modifiziert nach [Costa *et al.* 2012]). Abk.: HE: Hämogenes Endothel; HSZ: Hämatopoetische Stammzelle.

In Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums koexprimieren die Zellen noch endotheliale und hämatopoetische Marker. Sie sind erst VE-Cad⁺CD41⁺CD45⁻ und werden als pre-HSZ Typ I bezeichnet bevor sie CD45 exprimieren (pre-HSZ Typ II: VE-cad⁺CD45⁺) und anschließend zu funktionellen dHSZ ausreifen (CD45⁺CD150⁺CD48⁻) [Rybtsov *et al.* 2011]. Für den Übergang von CD41⁺ zu CD45⁺ Zellen wird Runx1 benötigt [Liakhovitskaia *et al.* 2014]. Um diese Schritte auch *in vitro* zu erreichen, benötigt man zuverlässige Protokolle, die eine effiziente und gerichtete Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in HSPZ ermöglichen. Eine robuste Strategie für die Herstellung von HSPZ ausgehend von pluripotenten Stammzellen wurde bis jetzt nur im Mausmodell durch die ektopye Expression des Homöodomänen Transkriptionsfaktors HOXB4 erreicht. Gene, die eine Homöobox enthalten werden bei Wirbeltieren *HOX*-Gene genannt. Die Homöobox Sequenz

codiert für eine Homöodomäne, eine Proteindomäne, die an DNA binden kann. *HOX*-Gene haben einen entscheidenden Einfluss auf die Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen und werden deshalb im nächsten Abschnitt detaillierter beschrieben.

1.6. Die Rolle von *HOX*-Genen

Während der Embryonalentwicklung sind Homöodomäne TF wichtige Regulatoren für die Festlegung der anatomischen Identität der einzelnen Körpersegmente. Sie werden entsprechend ihrer Anordnung auf den Chromosomen entlang der Körperachse gestaffelt aktiv (colineare Expression) und kontrollieren das Zellschicksal entlang der antero-posterioren Körperachse. *HOX*-Gene sind evolutionär hochkonserviert und wurden zuerst in *Drosophila* entdeckt und charakterisiert [Gehring 1985]. In *Drosophila* existieren 8 *HOX*-Gene, die in zwei Clustern auf einem Chromosom arrangiert sind. Duplikationen des originalen *HOX*-Genclusters haben zu 39 Genen in Säugetieren geführt, die auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Maus: *Hoxa-Hoxd*; Mensch: *HOXA-HOXD*) [McGinnis and Krumlauf 1992]. In Abb. 7 ist schematisch die Struktur der *HOX*-Cluster Anordnung gezeigt.

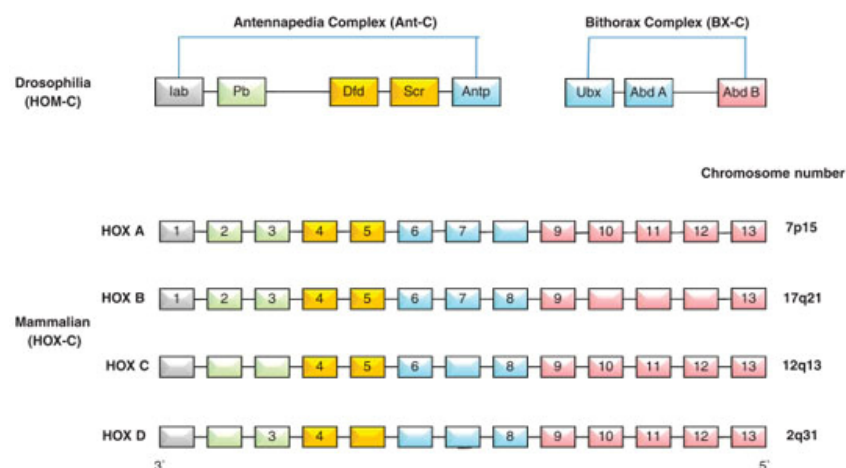


Abb. 7: *HOX*-Cluster Anordnung

Schematische Struktur der *HOX*-Cluster Anordnung in *Drosophila* und der humanen *HOX*-Gene. Der Farbcode beschreibt die Homologie zwischen *Drosophila* und humanen *HOX*-Genen [Alharbi *et al.* 2013].

Neben der Wirkung als Regionalisierungsgene haben *HOX*-Gene eine entscheidende Funktion während der Selbsterneuerung von HSPZ und während der Differenzierung in die verschiedenen hämatopoetischen Linien. Expressionsanalysen haben gezeigt, dass vor allem die Gene des *HOX*-Clusters A und B im hämatopoetischen Stammzellkompartiment in der Maus und im Menschen exprimiert werden, während sie im Zuge der Differenzierung in den meisten hämatopoetischen Linien wieder herunter reguliert werden [Sauvageau *et al.* 1994, Pineault *et al.* 2002]. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in hämatopoetischen Prozessen können Dysregulation und Translokation der *HOX*-Gene auch zu leukämischen Transformationen führen (zusammengefasst in [Argiropoulos and Humphries 2007]). Durch Überexpressions- und *knock-out* Experimente konnte der Einfluss der *HOX*-Gene auf das hämatopoetische System weiter aufgeschlüsselt werden.

1.7. Einfluss von HOXB4 auf das hämatopoetische System

HOXB4 war der erste TF, der *in vitro* und *in vivo* bei ektopter Expression zu einer Expansion von HSPZ der Maus [Sauvageau *et al.* 1995, Antonchuk *et al.* 2002, Kyba *et al.* 2002] und aus Nabelschnurblut isolierten humanen CD34⁺ Zellen führte [Schiedlmeier *et al.* 2003]. In seriellen Transplantationsversuchen hatte erstmals Guy Sauvageau gezeigt, dass eine forcierte ektope Expression des humanen HOXB4 das hämatopoetische Repopulationspotenzial von HSZ im Maussystem erhöht ohne eine Leukämie hervorzurufen [Sauvageau *et al.* 1995]. Die Zellen füllen den Stammzellpool in letal bestrahlten Mäusen auf und erhalten die Ausreifung der Zellen in alle Blutzelllinien aufrecht. Neben der Expansion von HSPZ unterstützt HOXB4 auch die hämatopoetische Differenzierung embryonaler Stammzellen in Richtung HSPZ [Helgason *et al.* 1996, Kyba *et al.* 2002, Rideout *et al.* 2002, Pilat *et al.* 2005, Chan *et al.* 2008]. Ohne Manipulation kommen die ESZ während der *in vitro* Differenzierung nicht über den Status hämatopoetischer Vorläuferzellen hinaus und besitzen nicht die Fähigkeit des Langzeitengraftments. Durch die Wirkung von HOXB4 können primitive hämatopoetische Vorläuferzellen weiter ausreifen und

erhalten einen definitiven hämatopoetischen Phänotyp, der die Zellen zur Langzeit-Repopulation befähigt [Kyba *et al.* 2002]. Unter ektopter HOXB4 Expression generierte ESZ-abgeleitete hämatopoetische Zellen (ESZ-HSZ) sind immunphänotypisch den im Knochenmark lokalisierten E-SLAM⁺ (CD150⁺CD48⁺CD45⁺CD201⁺) HSZ ähnlich [Lesinski *et al.* 2012]. Fötale Leber- und adulte HSZ können in der Maus über die Markerkombination CD150⁺CD48⁺CD45⁺CD201⁺ angereichert werden. Diese Zellen bezeichnet man als E-SLAM⁺ [Kent *et al.* 2009]. Vergleicht man das Wachstums- und Differenzierungsverhalten ektopter HOXB4 exprimierender ESZ-HSZ und adulten Knochenmarkszellen miteinander, sind diese *in vitro* und nach Transplantation in immundefiziente RAG2^{-/-}γC^{-/-} Mäuse vergleichbar [Pilat *et al.* 2005]. Zusammenfassend kann man HOXB4 zwei wichtige Funktionen während der Hämatopoese zuschreiben. Auf der einen Seite führt eine ektope Expression zur Expansion der HSPZ, auf der anderen Seite unterstützt das Protein die Entstehung von dHSPZ aus embryonalen Dottersack- und differenzierenden embryonalen Stammzellen, die sich *in vitro* und in Transplantationsexperimenten *in vivo* kaum an Qualität unterscheiden [Pilat *et al.* 2005]. HOXB4 defiziente HSZ haben ein reduziertes Proliferations- und Repopulationspotenzial, das einhergeht mit reduzierten Zellzahlen vor allem in der Milz (30%) und im Knochenmark (25%) von Hoxb3/b4^{-/-} Mäusen [Bjornsson *et al.* 2003]. In Bezug auf Selbsterneuerung und Differenzierung von HSPZ, ist die Aktivität von HOXB4 Dosis abhängig. Bei zu hohen HOXB4 Expressionshöhen kommt es zu einer Dysregulation der Myelopoese und Lymphopoese [Schiedlmeier *et al.* 2003, Klump *et al.* 2005, Pilat *et al.* 2005, Lesinski *et al.* 2012]. Eine Überexpression von HOXB4 hingegen verstärkt das Regenerationspotenzial von HSZ ohne Hinweise auf maligne Transformationen nach seriellen Transplantationsansätzen [Sauvageau *et al.* 1995, Thorsteinsdottir *et al.* 1999, Antonchuk *et al.* 2001]. Diese Beobachtungen zeigen umso mehr, wie wichtig es ist, den Regulationsmechanismus von HOXB4 zu verstehen, um gezielt und dosisabhängig therapeutische Ziele zu verwirklichen, wie zum Beispiel die Generierung von HSPZ aus pluripotenten Stammzellen. Für eine gezielte

therapeutische Anwendung ist es von großer Bedeutung herauszufinden, an welchem entscheidenden Abschnitt der hämatopoetischen Entwicklung HOXB4 überhaupt wirkt. Durch die Markierung der endogenen HOXB4 Expression in einer *Hoxb4*-YFP Reportermaus konnte gezeigt werden, dass die HSZ-Populationen aus dem Knochenmark, Dottersack, Plazenta und CD45⁺VE-cad⁺ Zellen aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) Region, *Hoxb4* exprimieren [Hills *et al.* 2011]. Die zu Grunde liegenden Mechanismen der Aktivität von HOXB4, die zu einer verstärkten Bildung, Selbsterneuerung und Differenzierung von HSPZ führen, sind nicht bekannt. Der Vorteil von ESZ, die einzelnen Stufen der hämatopoetischen Differenzierung zu rekapitulieren, macht sie für eine solch grundlegende Fragestellung unabdingbar. Ihre Anwendung ermöglicht, ein tiefergehendes Verständnis über die Wirkung des TFs während der ESZ-Differenzierung zu erhalten.

1.8. Zielsetzung

Bisher konnte nur durch eine ektope Expression von HOXB4 aus ESZ „künstliche“ HSZ hergestellt werden, die befähigt sind Blutbildung nach Transplantation in Mäuse zu übernehmen. Neben der unterstützenden Funktion von HOXB4 während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu HSZ [Kyba *et al.* 2002, Pilat *et al.* 2005, Chan *et al.* 2008], führt eine ektope Expression von HOXB4 auch zur Expansion von adulten HSPZ in Mäusen, *in vitro* und *in vivo* [Antonchuk *et al.* 2002, Schiedlmeier *et al.* 2007] und von humanen CD34⁺ HSPZ [Schiedlmeier *et al.* 2003]. Das macht den Transkriptionsfaktor zu einem attraktiven Kandidaten für den Einsatz in der Gen- und Zelltherapie. Ziel der Arbeit war es, die Rolle des Transkriptionsfaktors HOXB4 während der Entwicklung von HSPZ aus embryonalen Stammzellen der Maus zu untersuchen. Die Hauptaufgabe bestand darin, die Identität der Zelle herauszufinden, in der ektop exprimiertes HOXB4 zuerst seine Hämatopoese-fördernde Aktivität entfaltet. Außerdem bestand der Fokus dieser Arbeit darin, die grundlegenden Mechanismen der Modulation durch

HOXB4 während der ESZ-Differenzierung im Mausmodell-System zu klären. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Reporter-ESZ-Linien verwendet werden, die wichtige Entwicklungsstufen während der Differenzierung rekapitulieren, um damit Rückschlüsse auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors während der Hämatopoese zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Technische Ausstattung

Geräte	Modell (Hersteller)
Bestrahlungsanlage (Zellen)	320kV X-Ray Machine (GE/Pantak)
Durchflusszytometer	- Aria I (BD Biosciences) - Aria III (BD Biosciences) - FACS Calibur (BD Biosciences) - FC 500 (Beckman Coulter)
Geldokumentation	Red (Proteinsimple)
Inkubatoren	
- für Bakterienkulturen:	MaxQ™ 6000 (Thermo Scientific)
- für Zellkultur:	- HeraCell 240i (Thermo Scientific) - Binder
Magnetische Zellseparation	MACS MultiStand (Miltenyi Biotec) MidiMACS™ Separator (Miltenyi Biotec)
Mikroskope	- Axio Observer. Z.1 (Zeiss) - Axio Vert. A1 (Zeiss) - CKX41 (Olympus)
Milli-Q®	(Millipore)
pH-Meter	pH526 Wtw (Xylem)
Pipetten	- Multipette® (Eppendorf) - Eppendorf Research® (Eppendorf) - Pipetman Classic™ (Gilson)
Pipettierhelfer	Accu-Jet® Pro (Brand)
Real-Time PCR System	CFX96 (BioRad)
Spektralphotometer	NanoDrop 2000 (PeQlab)
Sicherheitswerkbänke	- HERAsafe KS (Thermo Scientific) - HERAsafe 2000 (Thermo Scientific)
Thermal Cycler	C1000 (BioRad)
Ultrazentrifuge	Optima L-80 XP (Beckman Coulter)

Waagen	- AJ H220 (Vibra) - 572 (Kern)
Zellzählgerät	CASY (Innovatis)
Zentrifugen	- Heraeus Fresco 21 (Thermo Scientific) - 5810 R (Eppendorf) - 5424 (Eppendorf) - Heraeus Pico 21 (Thermo Scientific)

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Material	Modell (Hersteller)
Aufsatzfilter: 0,22 µm (250 ml, 500 ml)	TPP (Trasadingen, CH)
Deckgläser	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Einfrierröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Einmalskalpelle (Gr.21)	Mediware (Lenexa, KS, USA)
Einmalspritzen (1ml, 5ml, 20ml, 40ml)	Braun (Melsungen)
Flachbodenplatten („6-, 12-, 48-, 96 Well“)	Greiner (Frickenhausen)
Flachbodenplatten („24 Well“)	Costar (Tewksbury, MA, USA)
Injektionsnadeln (G21)	BD Bioscience (San Jose, CA, USA)
Injektionsnadeln (18G11/2)	Becton Dickinson (Drogheda, IRL)
MACS Separationssäulen (LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mediumflaschen (100ml, 500ml)	Greiner (Frickenhausen)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Petrischalen (145/20 mm)	Greiner (Frickenhausen)
PCR-Platten	BioRad (Hercules, CA, USA)
PCR-Folie	BioRad (Hercules, CA, USA)
Pipettenspitzen: (1000 µl, 200 µl) (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)	Starlab (Ahrensburg) PeQLab (Erlangen)
Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Polypropylen-Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)

Polystyren-Rundbodenröhrchen (5 ml) mit Sieb (35 µm)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Protein LoBind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Reagenzienreservoir	Corning (New York, NY, USA)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Stabpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Spritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson (Madrid, E)
Spritzenfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Sartorius (Göttingen)
Verschlussfolie Parafilm	Bemis Flexible Packaging (Neenah; WI, USA)
Wägepapier, Mn 226 9x11,5cm	Machery-Nagel (Düren)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25 cm ²), Nunc TM	Thermo Scientific (Roskilde, DK)
Zellkulturflaschen (300 cm ²)	TPP (Trasadingen; Schweiz)
Zellkulturschalen (Ø10 cm)	TPP (Trasadingen; Schweiz)
Zellsiebe (40 µm, 70 µm Porengröße)	Biologix (Jiangsu; China)
Zentrifugationsröhrchen (3x3 ½ in.)	Beckmann Coulter (Krefeld)

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Reagenz:	Hersteller/Lieferant:	BestellNr.:
LE Agarose	Biozym (Oldendorf)	840004
Albumin aus Rinderserum	Sigma-Aldrich (Steinheim)	A0281
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)	A9518
CaCl ₂ -Dihydrat	Roth (Kalsruhe)	HN042
Chloroform	Merck (Darmstadt)	1.02445.2500
Chloroquin-Diphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)	C6628
4', 6-Diamidino-2-phenylindol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	D9542
DilAcLDL	Invitrogen (Oregon, USA)	L3484
Dimethylsulfoxid	Applichem (Darmstadt)	64291
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich (Steinheim)	D9891
DPBS (1x) (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	14190

ECGS (<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>)	Sigma-Aldrich (Steinheim)	E2759
EDTA-Dihydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)	E5134
Ethanol absolute; puriss	Sigma-Aldrich (Steinheim)	32205
0,07% Ethidiumbromid	inno-train (Kronberg)	GX12948
Gelatine (Schwein), TypA	Sigma-Aldrich (Steinheim)	G1890
Glycerin	Roth (Kalsruhe)	3783.1
HEPES-Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)	H3784
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich (Steinheim)	H7904
Matrigel	Corning	356231
MethoCult®GF	Stem Cell Technologies	M03434
Methylcellulose	Sigma-Aldrich (Steinheim)	M0512
NaCl	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)	1.06404.5000
NaOH	Merck (Darmstadt)	1.06495.5000
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)	P4020
Trizma® base	Sigma-Aldrich (Steinheim)	T1503
Trizma® HCL	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	T3253
TRIzol®	Ambion (Carlsbad, CA, USA)	15596026
Trypanblau 0,4%	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	15250-061
Trypsin-EDTA (10x) (5g/l Trypsin / 2g/l EDTA • 4Na)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	T4174
Wasser (Milli-Q® gereinigt) ¹	Millipore	

¹ Für das Lösen von lyophilisierten Zytokinen, für Verdünnungen molekularbiologischer Ansätze und für alle hier aufgeführten Lösungen wurde Milli-Q® (Millipore) gereinigtes Wasser verwendet.

2.1.4. Zelllinien

Aufgelistet sind alle Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet worden sind. Im nächsten Abschnitt wird der genetische Hintergrund der Reporter ESZ-Linien (*iRunx1*^{-/-}, *Runx1*^{Venus/+}, *Brachyury*^{GFP}) näher erläutert.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung der Zelllinie	Herkunft	Beschreibung	Bezugsquelle
293T	Mensch	Embryonale Nierenzellen	ATCC, # CRL-11268
HT-1080	Mensch	Fibrosarkoma Zelllinie	ATCC, # CCL-121
CF1-MEFs	Maus	Embryonale Fibroblasten	ASC, #ASF-1201
OP9	Maus, (C57BL/6 x C3H) F2 -op/op	Stromazelllinie aus der Schädelkalotte	ATCC, # CRL-2749
D4T Zellen (Tag 4 Large T SV40 immortalisiert)	Maus	EB-abgeleitete Endothelzelllinie	G. Lacaud, Cancer Research, Manchester, UK
CCE	Maus, 129/Sv	Embryonale Stammzelllinie	G. Keller, Universität Toronto, Canada
<i>iRunx1</i> ^{-/-} , E14tg2a	Maus, 129/Ola	Embryonale Stammzelllinie	G. Lacaud, Cancer Research, Manchester, UK
<i>Runx1</i> ^{Venus/+} , CCE	Maus, 129/Sv	Embryonale Stammzelllinie	S. I. Nishikawa, Riken Center for Dev. Biology, Kobe, Japan
<i>Brachyury</i> ^{GFP/+} , E14.1	Maus, 129/Ola	Embryonale Stammzelllinie	H. J. Fehling, Universität Ulm

2.1.5. Reporter- und *knock-out* ESZ-Linien

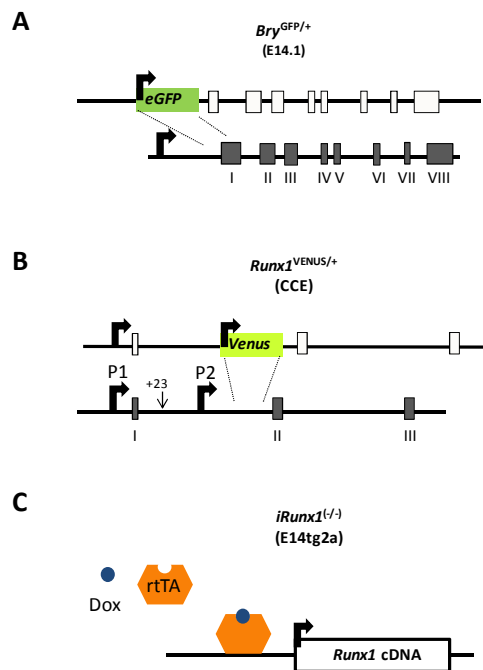


Abb. 8: Reporter- und *knock-out* ESZ-Linien

Dargestellt und beschrieben sind die verwendeten Reporter ESZ-Linien: **(A) *Bry*^{GFP/+} ESZ-Linie:** Die Entstehung des Mesoderms wurde über die Expression von *Brachyury* (*Bry*) mittels GFP-Reporter ESZ-Linie (*Bry*^{GFP/+}) verfolgt. Der Vektor wurde so designt, dass 2/3 des ersten *Bry* Exons ersetzt wurden durch eine GFP Expressionskassette [Fehling *et al.* 2003]. **(B) *Runx1*^{Venus/+} *knock-in* ESZ-Linie:** Zur Detektion der *Runx1* Expression, wurde Venus als Reportergen unter der Regulation des proximalen P2 Promotors von *Runx1* gesetzt [Hirai *et al.* 2005]. **(C) *iRunx1*^(-/-) ESZ-Linie:** Die induzierbare *Runx1* ESZ-Linie (*iRunx1*^(-/-)) basiert auf einen *Runx1* *knock-out* Hintergrund hervorgerufen durch einen hCD4 *knock-in* in Exon 3 und Exon 4. Die ESZ enthalten aber die komplette proximale *Runx1* cDNA. Reguliert wird die Expression über einen Doxyzyklin empfänglichen Promotor [Bronson *et al.* 1996, Telfer and Rothenberg 2001, Kyba *et al.* 2002, Lancrin *et al.* 2009, Sroczynska *et al.* 2009].

2.1.6. Zellkulturmedien und Zusätze

Aufgelistet werden alle Medien und Medienzusätze, die für die Zellkultur verwendet wurden

Tabelle 2: Verwendete Basalmedien

Basalmedien:	Hersteller/Lieferant:	BestellNr.:
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4,5 g/l Glucose)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	41969
Endothelial Basal Medium (EBM-2)	Lonza (Walkersville, MD, USA)	CC-3156
+ Supplements	Lonza	CC-4147

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (25 mM Hepes, ohne L-Gln)	Lonza (Verviers, B)	BE12-726F
KnockOut™ DMEM (1x)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	10829
MEM Alpha	Lonza (Verviers, B)	BE12-169F
Protein-Free Hybridoma Medium PFHM-II (1x)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	12040

Tabelle 3: Verwendete Medienzusätze

Medienzusätze	Hersteller/Lieferant:	BestellNr.:
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	A4544
Fetales Rinderserum (FBS) ²	Biochrom (Berlin)	80115
FBS (Gold) ³	PAA (Pasching, Austria)	A11-151
L-Glutamin 200mM, (100x)	Gibco (Auckland, NZ)	25030
IMDM, Puder	Gibco (Grand Island, NY, USA)	42200
MEM NEAA (100x)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	11140
2-Mercaptoethanol	Gibco (Grand Island, NY, USA)	31350
Methylcellulose	Fluka (Steinheim)	64630
Monothioglycerol (MTG)	Sigma-Aldrich (Steinheim)	M6145
Natriumpyruvat 100 mM, (100x)	Gibco (Grand Island, NY, USA)	11360
Penicillin-Streptomycin (P-S) 10.000 E/ 10mg/ml	cc pro (Oberdorla)	Z-13-M
holo-Transferrin (human)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	T 0665

² Für alle Standard-Zellkulturmedien

³ Verwendet und getestet für die Kultivierung und Differenzierung verwendeter ESZ-Linien, (LotNr.: A15110-3015) und für alle sich anschließenden Experimente

Zusammensetzung der Zellkulturmedien:

OP9-Medium	293T-Medium	HT-10/80 Medium
20% (v/v) FBS	10% (v/v) FBS	10% (v/v) FBS
100 E/0,1 [mg/ml] P-S	100 E/0,1 [mg/ml] P-S	100 E/0,1 [mg/ml] P-S
2 mM L-Glutamin	1 mM Natriumpyruvat	1 mM Natriumpyruvat
in Alpha MEM	in DMEM (4,5 g/l Glucose)	2 mM L-Glutamin
		1x MEM NEAA
		in DMEM (4,5g/lGlucose)
CF1-MEF	ESZ-Medium	Alpha 5 LIF-Zellen
10% (v/v) FBS	15% (v/v) FBS (Gold)	10% (v/v) FBS
100 E/0,1 [mg/ml] P-S	2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
1x MEM NEAA	1,5 x 10 ⁻⁴ M MTG	in Alpha MEM
1 mM Natriumpyruvat	100 E/0,1 [mg/ml] P-S	
2 mM L-Glutamin	LIF ⁴	
0,1 mM 2-Mercaptoethanol	in KnockOut™ DMEM (1x)	
in DMEM (4,5 g/l Glucose)		

⁴ *muriner Leukämie inhibierender Faktor (LIF): getesteter konditionierter Zellkulturüberstand (Abschnitt: 2.2.9)*

Embryoid-Body-(EB)- Differenzierungsmedium	STFV-Medium (HSZ-Medium)	Einfriermedium
15% (v/v) FBS (Gold)	10% (v/v) FBS (Gold)	10% DMSO
50 E/0,05 [mg/ml] P-S	100 E/0,1 [mg/ml] P-S	90% FBS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin	
[300 µg/ml] holo-Transferrin	[100 ng/ml] hFlt3-L	
5% (v/v) PFHM-II	[100 ng/ml] mSCF	
[50 µg/ml] Ascorbinsäure	[40 ng/ml] mTpo	
MTG 4 x 10 ⁻⁴ M	[40 ng/ml] hVEGF	
in IMDM	in IMDM	
D4T-Zellmedium	BL-CFC-Medium	Angiogenese- medium
10% (v/v) FBS	55% Methylcellulose 2x	EGM-2 Medium
MTG 1,5 x 10 ⁻⁴ M	10% (v/v) FBS	2% (v/v) FBS
[50 µg/ml] ECGS	3 x 10 ⁻⁴ M MTG	
2 mM L-Glutamin	[25 ng/ml] Ascorbinsäure	
100 E/0,1 [mg/ml] P-S	[300 µg/ml] holo-Transferrin	
in IMDM	25% D4T konditioniertes Medium (Abschnitt: 2.2.8)	
	[5 ng/ml] hVEGF	
	[10 ng/ml hIL-6]	
	2 mM L-Glutamin	
	50 E/0,05 [mg/ml] P-S	

2.1.7. Puffer und Lösungen

Ascorbinsäure (Stammlösung: [5 mg/ml]), sterilfiltriert

[5 mg/ml] Ascorbinsäure wurden in kaltem H₂O gelöst und für den Einmalgebrauch aliquotiert und bei -80°C gelagert.

BSA Stammlösung (1% (w/v)), sterilfiltriert

100 mg BSA wurden in 10 ml 1x PBS gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert

Doxzyklin (Stammlösung: [1 mg/ml]), sterilfiltriert

8 mg wurden in 8 ml 1x PBS gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Doxzyklin wurde immer lichtgeschützt aufbewahrt.

ECGS (Stammlösung: [5 mg/ml])

15 mg wurden in 3 ml 1x PBS gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

FACS-Proben-Puffer

1x PBS mit 4% FBS. Lagerung: 4°C

HEPES-gepufferte Salzlösung (HeBS, 2x), sterilfiltriert

280 mM NaCl

50 mM HEPES-Natriumsalz

1,5 mM Na₂HPO₄

in H₂O

Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,02 eingestellt.

holo-Transferrin (Stammlösung: [30 mg/ml])

1 g holo-Transferin wurde in 33,3 ml H₂O gelöst und aliquotiert

4-Hydroxytamoxifen (Stammlösung: [1 mM]), sterilfiltriert

5 mg 4-OHT [387,51 g/mol] wurden in 12,9 ml EtOH gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tris-EDTA Puffer (TE), pH 8,0

10 mM Tris-Cl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

50x Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE), pH8,5

242 g Tris base

57,1 ml Essigsäure

37,2 g Na₂EDTA 2H₂O

ad 1 Liter H₂O

2.1.8. Plasmide für die Virusproduktion

Alle verwendeten Plasmide wurden aus der Arbeitsgruppe Klump, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen, bezogen. (Plasmidkarten: siehe Anhang)

Vektorplasmide

In dieser Arbeit wurden FMEV basierende Vektorplasmide verwendet [Hildinger *et al.* 1998]. FMEV retrovirale Vektoren verbinden die LTR-Regionen des *Friend Mink Cell Focus-Forming Viruses* (FMCF) mit der 5' untranslatierten Region des *Murine Embryonic Stem Cell Viruses* (MESCV). Durch eine neue Koexpressions-Strategie wird HOXB4, unter der Kontrolle des *Spleen Focus-Forming Virus* Promotors (SFFVp) zusammen mit einem zytoplasmatischen Reporterprotein (*monomeric Plum* (mPlum), *tandem dimer Tomato* (tdTomato) oder *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP)) exprimiert und anschließend cotranslational in einem konstanten molaren Verhältnis über die 2A-Esterase separiert [Klump *et al.* 2001] (Abb. 9).

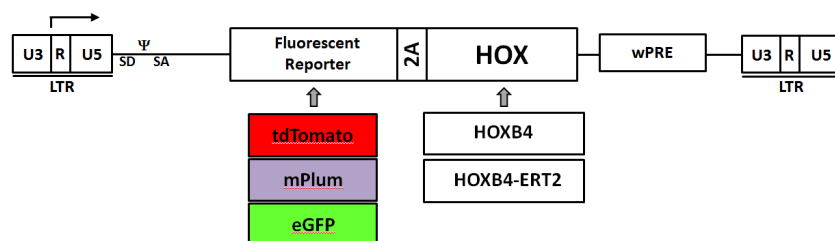


Abb. 9: Schematischer Überblick des γ-retroviralen HOXB4 Expressionsvektors

Für die konstitutive und induzierbare Expression von HOXB4 bzw. HOXB4ERT2 (ERT2: *estrogen receptor ligand binding domain*) und Reporterprotein wurde ein γ-retroviraler Vektor (FMEV) verwendet. Als Reporter kamen *tandem dimer* (td)Tomato, *monomeric* (m)Plum und *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) zum Einsatz. Die Separation des koexprimierten Fluoreszenzreporters wird über die 2A-Esterase des Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV-2A) oder *Thosea asigna* Virus (TAV-2A) vermittelt. Der integrierende Provirus wird von den LTR-Sequenzen flankiert. LTR: lange terminale Wiederholungen; U3: einzigartiges 3' Ende; R: redundante Region; U5: einzigartiges 5' Ende; 2A: Esterasesequenz; Ψ: Verpackungssignal; SD und SA: Splicing-Donor und -Akzeptor; wPre: woodchuck posttranskriptional regulatives Element.

Die Auswahl des Fluoreszenzproteins für HOXB4 richtete sich nach den Reporter ESZ-Linien und der Kombinationsmöglichkeit Fluoreszenz-konjugierter Antikörper (AK) für die Durchflusszytometrie und Zeitrafferaufnahmen. HOXB4 wurde

konstitutiv oder induzierbar (HOXB4ERT) exprimiert [Schiedlmeier *et al.* 2007]. Letzteres erfolgte durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), das an die Liganden-bindende Domäne des *Estrogen receptors (ER)* bindet. Dadurch gelangt das HOXB4ERT2 Fusionsprotein vom Zytoplasma in den Kern. Desweiteren enthält das Vektorplasmid das Verpackungssignal Ψ , für die Aufnahme der mRNA in die gebildeten viralen Partikel, als auch ein posttranskriptional regulatorisches Element (wPre), das die Transgenexpression verbessert [Donello *et al.* 1998]. Durch die Kotransfektion von 293T-Zellen mit zwei weiteren Plasmiden, die für das Hüllprotein (VSV-G bzw. K73) und Verpackungsproteine (gag, pol) codieren, entstehen replikationsdefekte pseudotypisierte Viruspartikel. VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert.

Liste der verwendeten Plasmide

SF91tdTomatoTAV2AHAHOXB4.wPRE

SF91tdTomatoTAV2AHAHOXB4ERT2.wPRE

SF91eGFP.wPRE

SF91eGFPFMDV2AHAHOXB4.wPRE

SF91mPlum.wPRE

SF91mPlumTAV2AHAHOXB4.wPRE

SF91mPlumTAV2AHOXB4ERT2.wPRE

M57-DAW: MLV gag/pol

K73 (eco): Hüllprotein (ecotrop)

pMD.G2: VSV-G Hüllprotein (amphotrop)

2.1.9. Reagenzsysteme

Reagenzsysteme:	Hersteller/Lieferant:	BestellNr.:
Anti-PE MicroBeads, mouse	Qiagen, Hilden	130-048-800
Feeder Removal MicroBeads, mouse	Qiagen, Hilden	130-095-531
Qiagen® Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen, Hilden	12263
QIAquick Gel Extration Kit	Qiagen, Hilden	28706

QuantiTect Rev. Transcription	Qiagen, Hilden	205311
QuantiFast SYBR Green PCR	Qiagen, Hilden	204057
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden	74104
Venor®GeM OneStep	Minerva biolabs	11-8250

2.1.10. Rekombinante Zytokine

Alle aufgelisteten Zytokine wurden und nach Herstellerangaben in 1x PBS mit 0,1% BSA gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Zytokine

Bezeichnung	Aktivität	Indikator Zelllinie	Bezugsquelle
Tpo, Maus	$\geq 1 \times 10^6$ units/mg	M07e Zellen	Peprtech
Flt3-Ligand, human	$\geq 1 \times 10^6$ units/mg	AML5 Zellen	Peprtech
SCF, Maus	$\geq 1 \times 10^5$ units/mg	TF-1 Zellen	Peprtech
hIL6, human	$\geq 1 \times 10^7$ units/mg	7TD1-Zellen	Peprtech
VEGF ₁₆₅ , human	1.0-8.0 ng/ml	HUVECs	Peprtech

2.1.11. Antikörper

Biotinylierte Antikörper wurden mit PerCP-Cyanine5.5 markiertem Streptavidin (eBioscience, # 45-4317-80) sekundär gefärbt.

Tabelle 5: Konjugierte Antikörper

Gensymbol*; Synonyme	Isotyp	Konjugat	Spezies	Klon	Bezugsquelle
Itg2a2b; CD41	IgG1, K	APC	Ratte	eBioMWReg30	eBioscience
Itg2a2b; CD41	IgG1, K	APC eFluor 780	Ratte	eBioMWReg30	eBioscience
Itg2a2b; CD41	IgG1, K	PE	Ratte	eBioMWReg30	eBioscience
Kdr; Flk1	IgG2a, K	FITC	Ratte	Avas12apha1	BD
Kit; c-Kit	IgG2b, K	PE-Cy7	Ratte	2B8	eBioscience
Tek; Tie2, CD202b	IgG1, K	APC	Ratte	TEK4	BioLegend
Cdh5; CD144, VE-cadherin	IgG1	BV 421	Ratte	BV13	BioLegend
Cdh5; CD144,	IgG1	Biotin	Ratte	eBioBV13	eBioscience

Gensymbol*; Synonyme	Isotyp	Konjugat	Spezies	Klon	Bezugsquelle
Cdh5; CD144,	IgG1	PE	Ratte	eBioBV13	eBioscience
Ptprc; CD45	IgG2b, K	FITC	Ratte	30-F11	eBioscience
Ptprc; CD45	IgG2b, K	APC	Ratte	30-F11	eBioscience
Pdgfrb;CD140b	IgG2a, K	Biotin	Ratte	APB5	eBioscience
Pecam1; CD31	IgG2a, K	PE	Ratte	390	eBioscience

* Offizielles Gensymbol nach Mouse Genome Informatics (MGI)

2.1.12. Oligodesoxynukleotide

Die Primer für die quantitative PCR wurden mit Hilfe von Primer-Blast (Primer3 und Blast) von NCBI generiert (Abschnitt: 2.3.3) oder von der Firma Qiagen (QuantiTect Primer Assay) erworben. Wenn möglich, wurden sie so designt, dass genomische DNA ausgeschlossen wird. Von jedem Primerpaar wurde die Effizienz bestimmt.

Tabelle 6: Sequenzen mausspezifischer Primer für die qRT-PCR

Zielgen	<i>forward</i> Primer, 5' → 3'	<i>reverse</i> Primer, 5' → 3'	Effizienz
<i>Gapdh</i>	CCGGGGCTGGCATTGCTCTC	GGGGTGGGTGGTCCAGGGTT	102,4 %
<i>Sox17</i>	ACGCTAGCTCAGCGGTCTACTAT	AAGGATTCCTTAGCGCTTCCAG	114 %
<i>Sfpi1</i>	AGCAGAGCTCAGATGAGGAGGAG	GGAAGTGGTACAGGCGAATCTTT	95,7 %
<i>Scl</i>	CCAACAACAACCGGGTGAAG	GCCGCACTACTTTGGTGTGAG	97,4 %
<i>Gata2</i>	GCTGCAGAGCACCTAACCG	CTTCTCTTATGCGGGTACTAGCC	100,3 %
<i>Gfi1b</i>	CAGGATGGGGAATCACCCTC	GGGGTCTGTGTGTAGCTGT	96,7 %
<i>Gfi1</i>	CTGTGCTAGGTATGGGAGAGGCG	GCCTTCTTCAGAACTCCCTTGGG	87,9 %
<i>Runx1</i>	ATGACCAGCCTCTCTGCAGAACT	AGATGGACGGCAGAGTAGGGAA	104 %
<i>Lmo2</i>	GACGGAAATTGTGCAGGAG	GATGCACAGAGACCATCCT	115 %

Tabelle 7: Primer für die qRT-PCR bezogen von Qiagen

Zielgen	Katalognummer	Effizienz
Actb	QT00095242	97,2 %

2.1.13. Material für Bakterien

LB-Medium (Luria-Bertani)

1% (w/v) Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 85,5 mM NaCl
 1 mM NaOH
 in H₂O gelöst und autoklaviert

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar
 autoklavieren

TFB1, sterilfiltriert

30 mM Kalium-Acetat
 100 mM Rubidiumchlorid
 10 mM CaCl₂
 15% (v/v) Glycerin
 pH-Wert auf 6,1 mit 0,2 M Essigsäure
 50 mM MnCl₂
 Lagerung: -20°C

TFB2, sterilfiltriert

10 mM MOPS
 75 mM Calciumchlorid
 10 mM Rubidiumchlorid
 15% (v/v) Glycerin
 pH-Wert 6,5 mit 1 M KOH
 Lagerung: 4°C

2.1.14. Software

Adobe Photoshop CS5	Adobe System
Bio-Rad CFX Manager	BioRad
CASYdatadoc	Innovatis
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software
EndNote X7.2.1	Thomson Reuters
FlowJo 7.6.5	Tree Star
Geneious 6.1.6	Biomatters
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Kaluza	Beckman Coulter
Microsoft® Office 2007	Microsoft
Zeiss Axio Vision 4.8	Zeiss

2.2. Zellbiologische Methoden

Alle beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter normoxischen (21% O₂, 5% CO₂, 37°C) oder hypoxischen (3% O₂, 5% CO₂, 37°C) Bedingungen im Zellinkubator. In regelmäßigen Abständen wurden alle Zellen auf Mycoplasmenkontamination mittels PCR überprüft (Venor®GeM OneStep).

2.2.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer oder die CASY®-Technologie von Schärfe System verwendet

2.2.1.1. Neubauer-Zählkammer

Aliquots der jeweiligen Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahl mit 0,4% Trypanblau-Lösung 1:2 bis 1:10 verdünnt und in 4 x 16 Einzelquadraten einer Neubauerkammer ausgezählt. Über Trypanblau werden tote von lebenden Zellen unterschieden, weil der Diazofarbstoff nur über eine defekte Zellmembran in die Zelle eindringen kann und diese dunkelblau anfärbt. Die Zellkonzentration in einem Mikroliter ergibt sich beim Auszählen 4 großer Eckquadrate. Man teilt die Anzahl der Zellen durch 4, um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Über die Kammertiefe (0,1 mm) und Fläche eines jeden Eckquadrates (1 mm²) und unter Berücksichtigung der Vorverdünnung erhält man die Anzahl der Zellen pro µl Volumen.

2.2.1.2. Das Casy® Messprinzip

Casy® ist ein automatisiertes Zellzählgerät und verbindet das Widerstandsmessprinzip mit der Methode der Signalverarbeitung (Pulsflächenanalyse). Dadurch ermöglicht die Casy® Technologie die Bestimmung folgender Parameter: Zellzahl, Zellvitalität, Zellgrößenverteilung, Zellvolumen, Zellaggregation und Zelldebris. Nachdem die Zellen in einer isotonischen Elektrolytlösung (CASY® ton) resuspendiert wurden, erfolgte die elektrische

Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Durch das Anlegen eines Niederspannungsfeldes über zwei Elektroden kommt es bei vitalen Zellen mit einer funktionierenden Zellmembran zu einer Widerstandserhöhung über die Kapillarstrecke, weil sie als elektrische Isolatoren fungieren. Tote Zellen hingegen werden nur über die Größe ihres Zellkerns erfasst und stellen somit keine elektrische Barriere da. Für eine standardisierte Beurteilung der Zellvitalität und exakte Einstellung der Größenverteilung je nach Zellpopulation, wird das Reagenz Casy®blue benötigt. Unter Verwendung von Casy®blue werden die Zellen gezielt abgetötet. Über das Setzen von Cursorpositionen (Auswertecursor, Normierungscursor), charakteristisch für jeden Zelltyp, können tote von lebenden Zellen getrennt werden. Ein Beispiel für die Positionierung der Cursorpositionen zur Abgrenzung des Zelldebris, toten und vitalen Zellen, soll an Hand von OP9-Zellen, die zur regelmäßigen Kokultivierung verwendet wurden, verdeutlicht werden (siehe Abb. 10).

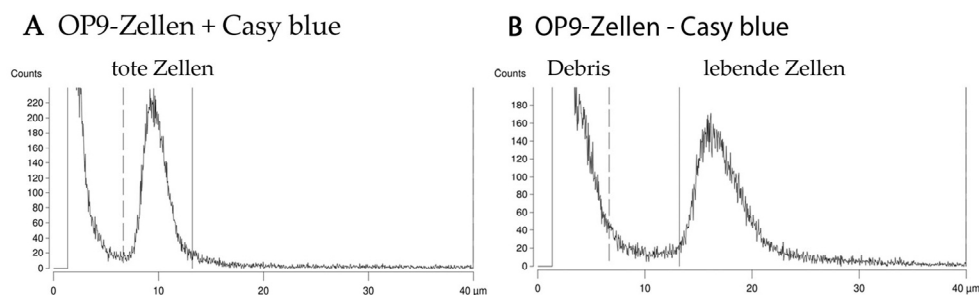


Abb. 10: Casyblue Evaluation mittels Casy

Vitalitätsbestimmung mit (A) Casyblue und (B) ohne Casyblue. Für jede Zellpopulation gibt es eine in µm definierte charakteristische Cursorposition zur Abtrennung von toten und lebenden Zellen (Auswertecursor, durchgezogene Linie) und zur Bestimmung von toten Zellen und Zelldebris (Normierungscursor; gestrichelte Linie). Angegeben ist die Anzahl gemessener Partikel (y-Achse) mit einer Zellgröße bis 40 µm (x-Achse) unter Verwendung einer 60 µm Kapillare (Messbereich: 1,2-40 µm).

2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden zentrifugiert (270xg, 5 min), in 4°C kaltem Einfriermedium (90% FBS, 10% DMSO) resuspendiert und für mindestens 24 Std. in einer Einfrierhilfe bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Im Stickstoff eingefrorene Zellen wurden unter ständigem schwenken im Wasserbad aufgetaut und direkt in das vorgewärmte (37°C) Kulturmedium überführt und anschließend zentrifugiert (270xg, 5 min), um DMSO Rückstände zu beseitigen.

2.2.3. Ablösen und Kultivieren adhärenter Zellen

Generell wurden adhärenente Zellen (OP9-, HT-1080-, 293T-Zellen), die einen einschichtigen Zellrasen über Ca^{2+} abhängige Proteine ausbilden mit Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst und bei 5% CO_2 , 21% O_2 , 37°C inkubiert.

2.2.3.1. OP9-Zellen

OP9-Zellen stammen ursprünglich aus der Schädelkalotte einer osteopetrotischen Maus (op/op Maus) [Yoshida *et al.* 1990, Kodama *et al.* 1994, Nakano 1996] und wurden von ATCC erworben. Sie produzieren keinen funktionsfähigen Makrophagen-stimulierenden Faktor (M-CSF) aufgrund einer Mutation im codierenden Gen. Die Zellen unterstützen die hämatopoetische Differenzierung. ESZ die auf OP9-Stroma gehalten werden, können primitive und definitive hämatopoetische Zellen hervorbringen [Nakano *et al.* 1994, Nakano 1995]. Die OP9-Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen mit 20 ml Komplettmedium (siehe: 2.1.6) kultiviert und alle drei bis vier Tage, nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90%, passagiert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit 2 ml 5x Trypsin/EDTA (Trypsin: 0,25% (w/v), 0,1% EDTA (w/v)) gespült und anschließend mit frischen 2 ml 5x Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei 37°C (5% CO_2 , 21% O_2) inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst und vereinzelt hatten, wurde zur Inaktivierung des Trypsins 10 ml Medium zugegeben und die Zellen bei 270xg 5 min pelletiert und in frisches Medium überführt.

2.2.3.2. 293T-Zellen

Bei 293T-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (HEK), die mit dem SV40 T-Antigen transformiert wurden. Sie lassen sich leicht transfizieren und werden für die Produktion von retroviralen Virusüberständen verwendet (siehe Abschnitt: 2.2.6). Sie wurden in 175 cm² Kulturflaschen kultiviert, nach Erreichen

einer 80%-igen Konfluenz passagiert oder für die Virusproduktion mit einer definierten Zellzahl ausgesät.

2.2.3.3. HT-1080-Zellen

HT-1080 ist eine humane Fibrosarkoma Zelllinie [Rasheed *et al.* 1974], die in dieser Arbeit für die Titration VSV-G pseudotypisierter Virusüberstände verwendet wurde. Die Kultivierung erfolgte in 175 cm² Kulturflaschen unter den in Abschnitt 2.1.6 beschriebenen Medienbedingungen.

2.2.4. Herstellung γ -bestrahlter embryonaler Mausfibroblasten (MEFs)

CF1-embryonale Mausfibroblasten (CF1-MEFs) dienten als Stromazellen für die ESZ-Kultur (hier: *iRunx1*-, *Bry*^{GFP/+}-, *Runx1*^{Venus/+}-ESZ), weil sie die Selbsterneuerungsteilung von ESZ unterstützen und die unkontrollierte Differenzierung vermeiden. Sie werden aus Mausembryonen gewonnen und sollten in einer frühen Passage verwendet werden. 1x10⁶ Zellen unbehandelter CF1-MEFs (Passage 2, *Applied StemCells*) wurden aufgetaut, in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bis Passage 5 in 300 cm² Flaschen expandiert. Um die Teilungsaktivität der Zellen für die Kokultivierung zu arretieren, wurden die Zellen mit 40 Gy (Bestrahlungsgerät: 320kV X-Ray Machine (GE/Pantak)) bestrahlt und in einer definierten Zellzahl eingefroren.

2.2.5. Kultivierung embryonaler Stammzellen

Die Kultivierung der PSZ erfolgte in gelatinierten (0,1% (w/v) Gelatine gelöst in PBS und autoklaviert) 25 cm² Kulturflaschen (PAA) (CCE ESZ) oder auf γ -bestrahlten CF1-MEF im 6 Well (alle ESZ-Reporter und *knock-out* Zelllinien, Abschnitt: 2.1.5). Standardmäßig wurden die ESZ in KnockOut™ DMEM und entsprechenden Zusätzen (siehe 2.1.6) bei 5% CO₂, 21% O₂ und 37°C gehalten.

2.2.5.1. CCE ESZ-Linie

CCE bezeichnet eine Maus Embryonale Stammzelllinie, die 1981 von Evans und Kaufman für die *in vitro* Zellkultur etabliert wurde [Evans and Kaufman 1981, Robertson *et al.* 1986]. 1993 hat Gordon Keller gezeigt, dass diese Zellen

hämatopoetisches Entwicklungspotential haben [Keller *et al.* 1993]. Die ESZ können auf gelatinierten Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten gehalten werden. Nach vorherigem Austesten haben sich 25 cm² Flaschen (Nunc™, Thermo Scientific) für die CCE-ESZ Kultivierung als am geeignetsten herausgestellt. Die 25 cm² Flaschen wurden mit 2 ml einer 0,1%igen Gelatinelösung (Gelatine (Schwein), TypA, Sigma) für ca. 30 min bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurde das konditionierte ESZ-Medium (siehe 2.1.6) vollständig entfernt, die Zellen 1-mal mit 2 ml PBS gespült, um anschließend die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA (0,05%) zu vereinzeln. Hierzu wurden 2 ml 1x Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben, sofort wieder entfernt, und die Flasche bei 37°C für 3 min stehen gelassen. Nach erfolgter Inkubation konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass sich die Zellen vereinzelt hatten, aber noch im ESZ-Verbund arrangiert waren. Durch Klopfen der Kulturflasche konnten die ESZ noch stärker vereinzelt werden, um sie schließlich nach erfolgter Zellzählung mittels Casy®Technologie (siehe 2.2.1.2) in einer Zelldichte von 8×10^4 bis 1×10^5 in 5 ml Medium weiter in Kultur zunehmen. Alle zwei Tage wurden die ESZ entsprechend auf neue 25 cm² Flaschen aufgeteilt. An den Passagefreien Tagen wurde das Medium komplett gewechselt.

2.2.5.2. **iRunx1⁻, Bry^{GFP/+}-, Runx1^{Venus/+}- ESZ**

Die Reporter- und *knock-out* ESZ-Linien wurden auf γ -bestrahlten (40 Gy) CF1-MEF gehalten. Dazu wurden die CF1-MEF 1-2 Tage vorher auf 6er Flachbodenplatten ausplattiert. Um Restbestände des Fibroblastenmediums zu entfernen, wurden die Stromazellen mit 1 ml PBS pro 6 Well gespült, bevor die ESZ umgesetzt wurden. Das anschließende Vereinzeln und Passagieren der Zellen erfolgte nach dem gleichen Vorgehen wie bei den CCE ESZ. Auf Stromazellen gehaltene ESZ brauchten nur alle drei Tage mit einer Dichte von 8×10^4 bis 1×10^5 in 2 ml ESZ-Medium pro 6 Well passagiert werden.

2.2.6. Herstellung retroviraler Partikel und Titration

Die Herstellung viraler Zellkulturüberstände erfolgte mit 293T-Zellen. Unter Verwendung VSV-G pseudotypisierter Viren, wurden die geernteten Zellkulturüberstände durch Ultrazentrifugation konzentriert und anschließend auf HT-1080-Zellen titriert. Für eine stabile, ektope HOXB4 Expression wurden ESZ mit den titrierten γ -retroviralen Virusüberständen transduziert. Die viruspartikelhaltigen Zellkulturüberstände wurden mit einer Infektionsdosis von 10 (*multiplicity of infection*, MOI: 10) zu den ESZ pipettiert. Nach 48 Std. wurde die Transduktionseffizienz mittels Fluoreszenzreporter im Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.6.1. Kalzium-Phosphat-vermittelte Transfektion von 293T-Zellen

Mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode wird Plasmid-DNA als Präzipitat in die Zellen gebracht. Zur Herstellung virushaltiger Überstände wurden 293T-Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden transfiziert, die für das humane HOXB4 Zielgen (Expressionsvektor; siehe Abb. 9), das retrovirale Hüllprotein (VSV-G bzw. K63) und Verpackungsproteine (gag, pol) codieren. Man nimmt eine HEPES-gepufferte Lösung, um ein Präzipitat aus Kalzium und Phosphat zu erhalten. Für eine effiziente Transfektion ist ein sehr feines Präzipitat aus Kalzium, Phosphat und DNA essentiell. Zunächst wurden 2×10^7 293T-Zellen pro 175 cm² Flasche ausplattiert, sodass man am Tag der Transfektion nach 24 Std. eine 80%-ige Konfluenz erhält. Dann wurden die Zellen mit 20 ml Transfektions-Medium (293T-Medium mit 10% (v/v) Hitze-inaktivierten FBS und 25 μ M Chloroquin) behandelt. Chloroquin erhöht die Integrität der Plasmid-DNA, indem es die Azidifizierung der Endosomen verhindert. Für die Bildung des Präzipitats wurden 1,5 ml 2x HeBS in ein steriles, konisches 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurde 1,5 ml einer Mischung aus Plasmid-DNA/CaCl₂ (15 μ g retroviraler Vektor, 15 μ g gag/pol, 6 μ g VSV-G, 150 μ l 2,5M CaCl₂ verdünnt in H₂O) unter blubbern tropfenweise zum 2x HeBS pipettiert, durch einen Vortexmischer vermischt und für 20 min stehen gelassen, damit sich ein Präzipitat bilden kann, das zum Schluss auf die Zellen

verteilt wurde. Durch einen anschließenden Mediumswechsel nach 6 Std. wurde das Chloroquin wieder entfernt und durch 18,5 ml frisches Medium (293T-Medium mit 10% (v/v) Hitze-inaktivierten FBS und 2% 1M HEPES) ersetzt. Nach 24 Std. wurde der erste Virusüberstand abgenommen, filtriert (0,45 µM CE Minisart® Filter) und bei 4°C gelagert. Für weitere 24 Std. wurden die 293T-Zellen erneut in 18,5 ml HEPES-gepuffertem Medium gehalten und anschließend der zweite Virusüberstand filtriert und mit dem ersten zusammengemischt. In einer vorgekühlten Ultrazentrifuge (BC Optima L-80 XP, Rotor: SW32) wurden die virushaltigen Überstände mit 90.000xg für 1:30 Std. bei 4°C in Zentrifugenröhrchen (BC, 1x3 ½ UC Tubes) konzentriert, anschließend in 400 µl HEPES-gepufferten 293T-Medium resuspendiert und entsprechende Aliquotmengen bei -80°C gelagert.

2.2.6.2. Titration virushaltiger Zellkulturüberstände auf HT-1080-Zellen

Die Bestimmung der Anzahl virushaltiger Partikel im Zellkulturüberstand erfolgte durch Titration auf HT-1080-Zellen. 4-6 Std. vor Titration wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro 24 Well in 1 ml ausgesät. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 1 ml frisches Medium (DMEM, 10% (v/v) Hitze-inaktiviertes FBS, [4 µg/ml] Protaminsulfat) ersetzt und in Doppelbestimmung die Virusüberstände in vier verschiedenen Mengen zugesetzt (1 µl, 0,3 µl, 0,1 µl, 0,03 µl), die Platte mit Parafilm umwickelt und zentrifugiert (90 min, 720xg, 32°C). Am nächsten Tag wurde der Überstand entfernt und durch 1 ml HT-1080-Medium ersetzt. 48 Std. nach Titration wurden die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA vereinzelt, mit PBS plus 10% (v/v) FBS abgestoppt und der Anteil transduzierter Zellen im FACS Calibur ermittelt. Mit nachstehender Formel (Formel: 1) konnte dann der Virustiter pro ml errechnet werden.

$$\text{Titer pro ml} = \frac{\% \text{ positive Zellen} \times \text{Zellzahl (Tag der Infektion)}}{\text{Volumen des Virusüberstandes}} \times 2 \quad (1)$$

2.2.7. Herstellung von 2x Methylcellulose für die EB-Differenzierung

1 Liter 2x Methylcellulose wurde in einem sterilen 2 Liter Erlenmeyerkolben angesetzt. Dafür wurden 450 ml autoklaviertes Wasser in einen 2 Liter Kolben mit einem Rührstab gefüllt und zum Kochen gebracht. Sobald das Wasser angefangen hat zu kochen, wurde der Kolben von der heißen Platte genommen und 20 g Methylcellulose-Puder zugegeben und erneut aufgekocht, bis sich das Puder gelöst hatte. Anschließend wurde das Gemisch erneut von der Heizplatte genommen und bis zur handwärme abkühlen gelassen. Während dessen wurde 2x Medium angesetzt, bestehend aus 450 ml Wasser, IMDM Puder für 1 Liter und 1 ml vom 150 mM MTG. Das Medium wurde steril filtriert, mit 2 mM L-Glutamin und 100 E/0,1 [mg/ml] P-S versetzt und zu der handwarmen Methylcellulose überführt. Das finale Gewicht wurde mit Wasser auf 1000 g eingestellt und die 2x Methylcellulose über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren abgekühlt. Am nächsten Tag wurden 40 ml Teilproben in 50 ml Zentrifugenröhrchen steril abgefüllt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.8. Produktion von konditioniertem D4T-Medium

Die D4T-Zellen wurden auf gelatinierten 75 cm² Zellkulturflaschen in entsprechendem Medium (Abschnitt: 2.1.6) mit [50 µg/ml] ECGS (*Endothelial Cell Growth Supplement*) gehalten. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde das Medium gegen frisches D4T-Medium ohne ECGS ausgetauscht und für 72 Std. konditioniert. Dieser Konditionierungsschritt wurde 1-mal wiederholt und am Ende beide Überstände zusammengefügt, filtriert und eingefroren (Lagerung: -20°C).

2.2.9. Herstellung des Leukämie inhibierenden Faktors (LIF) als konditionierter Zellkulturüberstand

Maus ESZ werden in LIF-konditioniertem Medium gehalten, um den pluripotenten Status der Zellen aufrechtzuhalten [Smith *et al.* 1988, Williams *et al.* 1988]. LIF inhibiert die Differenzierung *in vitro* kultivierter Maus ESZ über STAT3-Aktivierung (JAK/STAT Signaltransduktionsweg) [Niwa *et al.* 1998]. Für diese Arbeit wurde das LIF mit Hilfe von Alpha-LIF-5-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

H. Beug, IMP, Wien) produziert und an CCE ESZ getestet. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und für die Gewinnung des LIF-konditionierten Mediums auf 5 Flaschen passagiert (Trypsin-EDTA (1x)). Nach 72 Std. wurde der 1. Zellkulturüberstand gesammelt und zentrifugiert (10 min, 270xg), damit die Zellen pelletiert und der Überstand steril filtriert werden konnte. Anschließend wurde das konditionierte Medium jeweils mit 10 ml auf 15 ml Zentrifugenröhrchen verteilt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Überstand 2 und 3 wurde jeweils nach weiteren 48 Std. gesammelt und gleich behandelt. Die biologische Wirksamkeit der neu produzierten LIF-Überstände (1, 2, 3) wurde auf CCE ESZ im Vergleich zur bestehenden Charge getestet. Das neu produzierte LIF wurde 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000 in ESZ-Medium verdünnt und die Zellen darin für mindestens zwei Wochen kultiviert. Ein vergleichbares Verhältnis zur Referenz bestimmte den max. Verdünnungsfaktor für die neue Charge.

2.2.10. Überblick über die hämatopoetische ESZ-Differenzierung

In Abb. 11 ist das experimentelle Vorgehen für die ESZ-Differenzierung übersichtlich dargestellt. Der erste Schritt ist die Transduktion der ESZ mit Viruspartikeln.

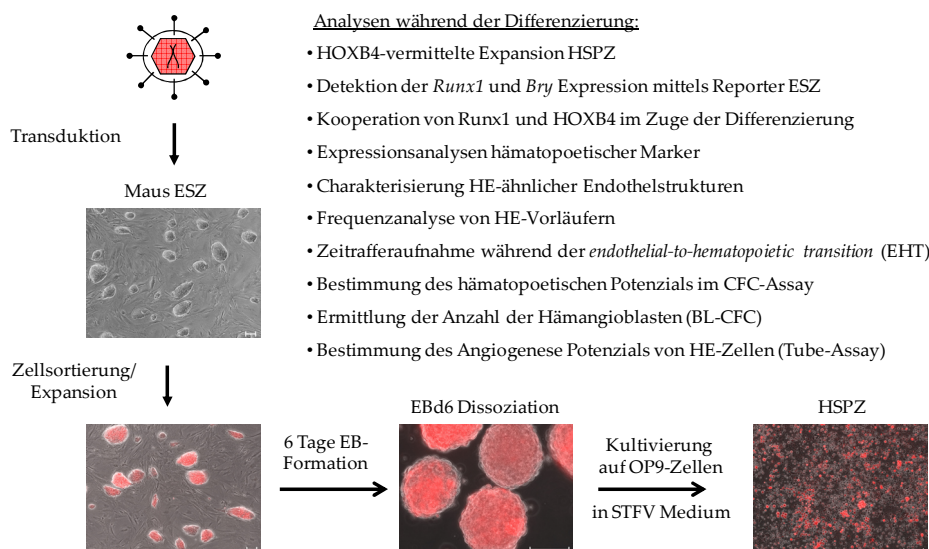


Abb. 11: Experimenteller Aufbau

Die ESZ wurden mit Viruspartikeln transduziert und anschließend mittels Fluoreszenzsignal durchflusszytometrisch sortiert und expandiert. Hier exemplarisch gezeigt für ESZ transduziert mit dem Expressionsvektor für tdTomato/HOXB4. Nach 6 Tagen EB-Differenzierung wurden die EBs (EBd6) dissoziiert und mit OP9-Zellen kokultiviert bis hämatopoetische Zellen entstanden sind (OP9dx). STFV-Medium: SCF, Tpo, Flt3-L, VEGF

Für alle Ansätze wurde eine MOI von 10 gewählt. Reporter exprimierende Zellen wurden sortiert, expandiert und schließlich für sechs Tage in Form von 3-dimensionalen Hohlkörperchen (EBs) in Suspension differenziert. Anschließend wurden die EBs dissoziiert und mit OP9-Zellen in STFV-Medium (S: *Stem Cell Factor*: (SCF), T: *Thrombopoietin* (TPO), F: *Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand* (Flt3-L), V: *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)) [McKinney-Freeman *et al.* 2009] kokultiviert. Neben Genexpressionsanalysen, immunphänotypischen Untersuchungen, Zeitrafferaufnahmen, wurden die Zellen auch hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials im BL-CFC-, hämatopoetischen CFC- und Angiogenese-Assay untersucht.

2.2.11. Zellseparation mittels MACS

Die auf CF1-MEF kultivierten ESZ wurden erst nach Entfernung der Fibroblasten mittels MACS® Technologie in LS Säulen (*Feeder Removal Micro Beads, Mouse*; Miltenyi) transduziert. Die ESZ wurden wie bereits beschrieben geerntet und die Zellzahl im Zellzählgerät (CASY) bestimmt. Anhand der Gesamtzellzahl berechnet sich die Menge der zu verwendenden Magnetpartikel für die Abreicherung der ESZ von den CF1-MEF. Alle damit verbundenen Schritte richteten sich nach dem Standardprotokoll von Miltenyi.

2.2.11.1. Entfernung der OP9-Zellen aus der Kokultur mittels MACS

Mit Hilfe der MACS® Technologie konnten auch HE-Kolonien und hämatopoetische Zellen von OP9-Zellen mittels CD140b-PE Anti-PE Micro Beads angereichert werden. Es wurde nach dem Standardprotokoll für Anti-PE MicroBeads von Miltenyi vorgegangen.

2.2.12. Transduktion von ESZ

Nach erfolgreicher Separation der ESZ mittels MACS wurde erneut die Zellzahl (Casy) bestimmt und 1×10^5 Zellen pro 24 Well (Suspensionsplatte) in 1 ml Medium (ESZ-Medium, 20 mM HEPES, [4 µg/ml] Protaminsulfat, Virusüberstand: MOI:10) ausplattiert und bei 32°C und 711xg für 60 min zentrifugiert. Anschließend wurden

die Zellen wieder auf CF1-MEF im 6 Well Format kokultiviert bzw. im Fall von CCE ESZ in 25 cm² Flaschen gehalten. Bei jedem Transduktionsansatz wurden ESZ als Kontrolle (Kontr.) mitgeführt, die gleich behandelt wurden. Hierzu wurde der Anteil des Virusüberstandes gegen Wasser ausgetauscht. 2-3 Tage später wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. Wenn die Zellen nicht > 70% HOXB4⁺ waren, wurden sie durch Zellsortierung weiter angereichert.

2.2.13. *Embryoid Body-Formation*

48 Std. vor der EB-Formation wurden die ESZ an das neue EB Differenzierungsmedium (Abschnitt: 2.1.6) adaptiert. Es erfolgte hierfür nur der Austausch des Basalmediums KnockOut™ DMEM gegen IMDM. Alle weiteren Medienzusätze blieben unverändert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen trypsinisiert und die Reaktion mit IMDM plus 15% (v/v) FBS (ohne LIF) abgestoppt, anschließend gezählt und die Vitalität (Casy) bestimmt. ESZ, die auf CF1-MEF gehalten werden, mussten erst über MACS LS Säulen (*Feeder Removal Micro Beads, Mouse*; Miltenyi) von den Fibroblasten getrennt werden. Anschließend wurden 1,5x10⁵ Zellen in unbehandelte Petrischalen (145/20mm, Greiner) mit 30 ml EB-Differenzierungsmedium ausplattiert. In diesem Protokoll wurde der üblicherweise verwendete Anteil der Methylcellulose gegen IMDM ausgetauscht. So konnten bereits in den ersten Tagen der Differenzierung Zellen für die RNA-Analyse gewonnen werden. Am Tag 5 der Differenzierung wurden die EBs geerntet, zentrifugiert (20xg, 2 min) und vorsichtig mit 30 ml für einen weiteren Tag ausplattiert. Am Tag 6 wurden die EBs (EBd6) erneut geerntet und in ein 50 ml Falcon transferiert. EBs, die sich am Boden festgesetzt hatten wurden mit 1x Trypsin/EDTA vom Boden der Petrischale gelöst, vereinzelt und in das gleiche Falcon pipettiert. Dann erfolgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei 270xg. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1 bis 4 ml (abhängig vom Erntetag) 1x Trypsin/EDTA aufgenommen, für 4 min im Wasserbad geschwenkt, mit purem FBS abgestoppt und die Zellen sofort stark vereinzelt, bevor sie durch ein 70 µm Zellsieb filtriert wurden. Nach erneuter Zentrifugation (270xg, 5

min) wurde das Pellet in FACS-Proben-Puffer resuspendiert und die Zellzahl im Casy-Zellzählgerät bestimmt.

2.2.14. Hämatopoetische Differenzierung und Bildung von Endothelstrukturen

Die gerichtete, hämatopoetische Differenzierung erfolgte nach 6-tägiger EB-Formation auf OP9-Zellen in STFV-Medium (Abschnitt: 2.1.6). Für die Kokultivierung mussten die OP9-Zellen im Vorfeld mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 6 Well ausgesät werden, sodass sie am Tag der Differenzierung maximal konfluent waren. Für jede Probe wurde die gleiche Anzahl an OP9-Zellen ausgesät. Am Tag 6 wurden die EBs geerntet, vereinzelt (wie unter Abschnitt: 2.2.13 beschrieben) und nach Zellzahlbestimmung mit 1×10^5 Zellen pro 6 Well auf OP9-Zellen für mehrere Tage in 2 ml STFV-Medium und unter hypoxischen Bedingungen (5% CO₂, 3% O₂, 37°C) kokultiviert. Zwischen Tag 2 und 3 der Differenzierung haben sich die ersten wirbelartigen Endothelstrukturen gebildet und konnten am Tag 3 aufgrund Ihrer Größe und plattenartigen Struktur gut mikroskopisch quantifiziert werden. Zeitgleich konnten auch die ersten hämatopoetischen Suspensionscluster detektiert werden. Die Endothelkolonien und die HSPZ wurden immunphänotypisch und anhand ihrer Genexpression näher charakterisiert.

2.2.15. BL-CFC-Assay

Der Vorteil des ES/EB-Systems ist, dass man frühe Stadien während der Embryonalentwicklung untersuchen kann. EBs bilden in Anwesenheit von Interleukin-6 (IL-6), vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und Endothelzell-konditioniertem Medium (D4T-konditioniertes Medium, siehe Abschnitt: 2.2.8) zwischen Tag 2,5 und 3,5 Blast-Zell-Kolonien in Medium mit Methylzellulose (Abschnitt: 2.1.6.). Blast-Kolonien besitzen endotheliales und hämatopoetisches Potenzial, das von einer Blast-Kolonie-bildenden Zelle (BL-CFC) ausgeht, weshalb sie auch als das *in vitro* Äquivalent des Hämangioblasten angesehen wird [Choi *et al.* 1998]. Nach vorheriger Messung der Flk1 Expressionskinetik während der EB-Differenzierung, hat sich Tag 3,5 als bester

Zeitpunkt für den Ansatz des BL-CFC-Assays erwiesen. 5×10^5 ESZ wurden pro Petrischale (145/20mm) für 3,5 Tage ausgesät (5% CO₂, 21% O₂, 37°C). Anschließend wurden die EBs wie beschrieben geerntet und die Zellzahl im Casy-Zellzählgerät bestimmt. 5×10^6 Zellen wurden für die Flk1-APC Färbung und anschließender Sortierung im FACS Aria verwendet. 3,5 ml Hämangioblastenmedium wurden zuvor für eine Triplikatbestimmung mit einer Nadel und 5 ml Spritze in ein 5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und 100 µl einer Zellsuspension mit $1,5 \times 10^5$ Flk1⁺ Zellen zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit dem Medium gut vermischt und für 5 min stehen gelassen, damit sich die Luftblasen auflösen konnten. Anschließend wurden 5×10^4 Zellen (1 ml) mit einer Nadel (18GA1/2) und 1 ml Spritze in eine 35 mm große Petrischale pipettiert. Zum Schutz gegen Austrocknung, wurden die Zellen für 4-5 Tage zusammen mit nur PBS gefüllten Petrischalen in einem Übergefäß (Petrishalen 145/20mm) inkubiert (5% CO₂, 3% O₂, 37°C). Nach Inkubation wurden die Kolonien ausgezählt und anhand der Morphologie in den Blast- oder sekundären (sek.) EB-Kolonietyt eingeteilt (Abb. 12).

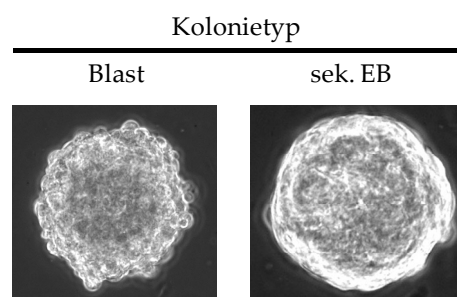


Abb. 12: Beispiel-Aufnahme einer Blast-Kolonie und sekundären EB-Kolonie

Aufnahme von einer typischen Blast- und kompakten Kolonie (sek. EBs) am Tag 4 in Hämangioblastenmedium. Phasenkontrastaufnahme, 200x Vergrößerung

2.2.16. *In vitro* Angiogenese mit Matrigel

Endothelzellen haben das Potenzial im Matrigel tubulärartig verzweigte Strukturen zu bilden, weil sie angiogenetisch aktiv sind. Die extrazellulären Matrixproteine extrahiert aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkom Tumor und entsprechende Wachstumsfaktoren (TGF-beta, EGF, IGF, FGF, Plasminogenaktivator etc.) im Matrigel unterstützen die Ausbildung tubulärartiger Netzwerke mit

Verzweigungspunkten und Schleifenbildungen. Dieser *in vitro* Angiogenese Assay (*Tube Formation Assay*) wurde deshalb verwendet, um strukturelles Endothel von hämogenem Endothel unterscheiden zu können. Der Versuch wurde in μ -Angiogenese Platten (96-iger Vertiefungen) von Ibidi durchgeführt, indem 10 μ l von dem über Nacht auf Eis aufgetautem Matrigel in die innere Vertiefung luftblasenfrei pipettiert wurden. Die Platte mit Matrigel wurde anschließend für 20 min zur Polymerisierung in den Inkubator gestellt. Danach wurden 4×10^4 Zellen pro Vertiefung in 70 μ l EGM-2 Medium (EBM-2 + Supplements) für 19 Std. bei 5 % CO₂, 3 % O₂ und 37°C auf dem Matrigel verteilt.

2.2.17. Hämatopoetischer Koloniebildungsassay (CFC-Assay)

Der *Colony-Forming Cell* (CFC)-Assay wurde gewählt, um das hämatopoetische Potenzial HE-abgeleiteter Suspensionszellen beurteilen zu können. Retrospektiv kann so der Determinierungszustand hämatopoetischer Zellen festgestellt und in fünf Kolonietypen eingeteilt werden. Man unterscheidet nach Form und Größe folgende Kolonietypen: Den CFU-E (*colony-forming-unit-erythroid*), BFU-E (*burst-forming-unit-erythroid*), CFU-G (*colony-forming-unit-granulocyte*), CFU-M (*colony-forming-unit-macrophage*), CFU-GM (*colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*) und den multipotenten CFU-Mix (*colony-forming-unit-erythroid-myeloid*) Kolonietyp. Eine definierte Zellzahl (in der Regel 500 Zellen) wurde mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung in 1 ml semisolider Methylcellulose (MethoCult #03434, Stem Cell Technologies, beinhaltet: Methylcellulose in IMDM, FBS, BSA, rh Insulin, human Transferrin, 2-Mercaptoethanol, rmStem Cell Factor (SCF), rmIL-3, rhIL-6, rh Erythropoetin) sortiert, gemischt und in zwei 24er Wells überführt. Um das Austrocknen zu verhindern, wurde noch PBS ringsherum um die Ansätze pipettiert, die Platte für 12 Tage inkubiert (5 % CO₂, 3 % O₂ und 37°C) und anschließend mikroskopisch ausgewertet (Axio Vert. A1).

2.2.18. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die physikalischen und molekularen Eigenschaften von einzelnen Zellen innerhalb eines Zellgemisches bestimmt werden. Die Technik der Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting*: FACS) ermöglicht zusätzlich, dass Zellpopulationen mit gleichen Eigenschaften voneinander getrennt werden können. Dadurch können z.B. fluoreszenz-markierte Zellen detektiert und entsprechend sortiert werden. Diese Möglichkeit der Anreicherung von verschiedenen Subpopulationen während der ESZ-Differenzierung wurde in dieser Arbeit genutzt, um den Einfluss von HOXB4 auf das hämatopoetische Entwicklungsprogramm näher einzugrenzen. Damit die Zellen auf Einzelzellebene analysiert werden können, erfolgt nach der Probenaufnahme im Flüssigkeitsstrom die hydrodynamische Fokussierung. In der Messkammer passieren die Zellen einen gebündelten Laserstrahl und erzeugen Streulicht, welches über Photoelektronenvervielfacher (*photomultiplier tube*: PMT) umgewandelt und verstärkt wird. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße) und das Seitwärtsstreulicht (SSC) proportional zur Zellgranularität. Desweiteren können Zellen mit Hilfe des Laserlichts über die Anregung von Fluorochromen näher charakterisiert werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht, das proportional zur Zahl der Fluorochrommoleküle ist, wird über verschiedene optische Filter (Langpass-, Kurzpass, Bandpassfilter) und Spiegel aufgetrennt, in ein elektronisches Signal umgewandelt, verstärkt und anschließend digitalisiert. In Abhängigkeit der zu messenden Fluoreszenz, wurde der FACSCalibur™ von BD hauptsächlich zur Bestimmung des Virustiters verwendet und für alle weiteren Messungen und Sortierungen kam der FACSriaI™ (130 µm Nozzle) von BD zum Einsatz, der eine 3-Laser-9-Farben Konfiguration hat (Blaue Laser: 488 nm, Rote Laser: 633 nm, Violette Laser: 405 nm). Gegen Ende dieser Arbeit wurde der FACSriaI™ zum FACSriaIII™ aufgerüstet (4-Laser-14-Farben Konfiguration: Blaue Laser: 488 nm, Gelb-Grüne Laser: 561 nm, Rote Laser: 633 nm, Violette Laser: 405 nm, 100 µm Nozzle).

2.2.18.1. Messung und Zellsortierung

Das Sortieren der Zellen hat den Vorteil, dass bestimmte Zellpopulationen physikalisch aufgetrennt und in separaten Gefäßen aufgefangen werden können. Dazu wird unmittelbar nach der Messung des Signals, bei einer definierten Frequenz (hier: 14 kHz) und Amplitude, der Flüssigkeitsstrahl zum Schwingen angeregt, sodass der Strahl am Tropfenabrisspunkt zu einzelnen Tropfen übergeht. Der Flüssigkeitsstrahl wird für eine kurze Zeit elektrisch geladen, damit der Tropfen mit der entsprechenden Zelle an zwei Kondensorplatten abgelenkt werden kann. Vor jeder durchflusszytometrischen Messung wurde der *drop delay* (Distanz zwischen Messung und Tropfenabriss) mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Kalibrierungsbeads (BD FACS Accudrop Beads) ermittelt. Das simultane Messen verschiedener Fluoreszenzen erfordert zusätzlich die Korrektur spektraler Überlappungen durch Kompensation. Dafür wurden Zellen mit nur jeweils einem Fluorochrom gefärbt. Um bei Mehrfachmessungen eine definierte Trennung zwischen positiven und negativen Zellen zu gewährleisten, und um nur sehr schwach exprimierte Oberflächenantigene abgrenzen zu können, wurden Fluoreszenz-Minus-Eins (FMO) Kontrollen mitgeführt [Tung *et al.* 2004]. Unspezifische Bindungen wurden durch das Mitführen von Isotypenkontrollen ausgeschlossen. Eine ungefärbte Probe wurde für die Einstellung der *Photomultiplier Tube*- (PMT) Spannungen eingesetzt. Die Zellen wurden nach Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Casy in PBS mit 4% FBS (FACS-Puffer) überführt. Die mittels CASY bestimmte Vitalität in Prozent wurde in regelmäßigen Abständen im Durchflusszytometer durch die Verwendung des Zellfarbstoffs DAPI (Endkonzentration: [0,1 µg/ml]) kontrolliert. Die DNA von Zellen kann nur dann mit DAPI markiert werden, wenn die Membran nicht mehr intakt ist. Damit die Zellen in einzelne Subpopulationen aufgetrennt werden konnten, wurde diese mit Fluoreszenz-markierten- oder Biotin-markierten Antikörpern (AK) gefärbt. Die AK Färbung erfolgte in 100 µl Puffer, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Zuerst wurde der FcR-Block (anti-CD16/32) für 10 min bei 4°C durchgeführt und anschließend die AK-

Färbung (Menge nach Herstellerangaben) für weitere 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml 1x PBS. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (300xg, 10 min), der Überstand entfernt, in geeignetem Volumen resuspendiert und durch ein steriles Zellsieb (Polystyren Rundbodenröhrchen mit Zellsieb; 35 µm Porengröße) filtriert, um Aggregatbildungen zu vermeiden. Unter Verwendung von biotinylierten-AK wurden die Zellen erneut in 100 µl Puffer aufgenommen, zentrifugiert und mit Streptavidin-gekoppelten Fluorochromen sekundär gefärbt. Alle zu sortierenden Zellsuspensionen wurden, den Zellen entsprechend, in Basalmedium mit 4% FBS aufgenommen, filtriert und während der Sortierung in Polypropylen-Rundbodenröhrchen, mit 200-300 µl vorgelegtem Medium (4% FBS in Basalmedium) aufgefangen. Zum Ausschluss von Zelldebris und Zellaggregaten wurde die Zielpopulation durch das Setzen von Grenzen (*Gates*) im FSC-A/SSC-A Diagramm ausgewählt und über FSC-H/FSC-W und SSC-H/SSC-W ausgeschlossen. Über eine Reanalyse (RA) wurde die Sortierungseffizienz bestimmt und die Probe gegebenenfalls ein zweites Mal sortiert. Die entstandenen Datensätze wurden mit der Kaluza und FlowJo 7.6.5 *Software* ausgewertet.

2.2.18.2. **Ausschluss der OP9-Zellen in durchflusszytometrischen Messungen**

Nach 6-tägiger EB-Formation wurden die Zellen auf OP9-Zellen kultiviert und die entstehenden hämatopoetischen Zellen und Endothelstrukturen im Durchflusszytometer auf die Expression Endothel- bzw. Hämatopoese-assoziiierter Oberflächenantigene überprüft. Die OP9-Zellen exprimierten nicht CD41, CD45, Flk1, VE-cad, Kit, Tie2 und sie nahmen auch kein DilAcLDL auf; alles Marker, die für die Charakterisierung des HEs und HSPZ verwendet wurden. Die OP9-Zellen sind aber im Gegensatz zu HE- und hämatopoetischen Zellen PDGF-Rezeptor b⁺ (*Platelet-derived Growth Factor-beta*, CD140b) und konnten aus der Kokultur ausgeschlossen werden. Dies erfolgte mit einem CD140b Biotin-konjugierten AK, der über Streptavidin-(SA)-Peridinin-Chlorophyll-Protein-(PerCP)-Cyanin-(Cy5.5) markiert wurde. In Abb. 13A wird deutlich, dass die OP9-Zellen zu annähernd 100% CD140b

positiv waren und von den HSPZ über das Setzen von Grenzen durchflusszytometrisch voneinander getrennt werden konnten (Abb. 13B).

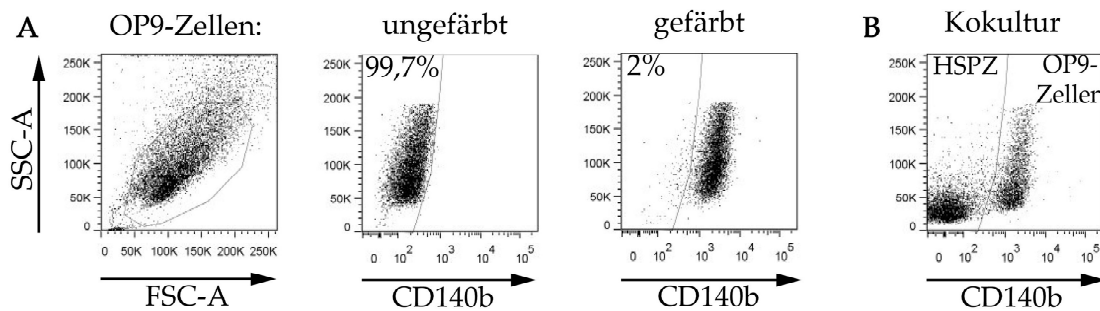


Abb. 13: Ausschluss der OP9-Zellen

(A) Die OP9-Zellen exprimieren den Oberflächenmarker CD140b (PDGF-Rezeptor b). (B) Durch die Expression von CD140b können die OP9-Zellen durchflusszytometrisch von den HSPZ getrennt werden (Tag 12 Kokultur).

2.2.19. Zeitrafferaufnahmen

Die Zeitrafferaufnahmen wurden mit dem Axio Observer. Z.1 (Zeiss) Mikroskop aufgenommen und mit dem Zeiss Axio Vision 4.8 Programm ausgewertet.

2.2.19.1. Aufnahme einer CD41 exprimierenden hämatopoetischen Zelle

Dokumentiert wurde die Expression von CD41 auf der Zelloberfläche einer einzelnen Suspensionszelle, die aus eGFP/HOXB4 transduzierten ESZ (CCE) entstanden ist. In einem Intervall von 15 min erfolgten ab Tag 5 auf OP9-Zellen für insgesamt 2 Tage die Zeitrafferaufnahmen mit Hilfe eines inversen Zeiss Fluoreszenzmikroskops unter konstanten Bedingungen (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 100x Vergrößerung). Der Anti-CD41 PE-konjugierte AK (Konzentration: [20 ng/ml]) wurde alle 8 Std. in das Medium gegeben.

2.2.19.2. Dokumentation der Transition von Endothelzellen zu HSPZ (EHT)

Die Endothel-zu-Hämatopoese Transition (EHT) wurde mit iRunx1-Zellen (Abb. 8) ab Tag 4 auf OP9-Zellen kontinuierlich für 72 Std. dokumentiert. Phasenkontrastaufnahmen wurden alle 10 min mit einer 200x Vergrößerung unter konstanten Kulturbedingungen (37°C, 5 % CO₂, 3 % O₂) mit dem Axio Observer. Z.1 aufgenommen. Damit der Übergang bis zur Entstehung der ersten CD41⁺ hämatopoetischen Zellen dokumentiert werden konnte, wurde mit der Doxzyklin

(Dox) Zugabe [0,1 µg/ml] bereits am Tag 2 und 4 während der OP9 Kokultur begonnen. Zellen ohne *Runx1* Induktion dienten als Kontrolle.

2.2.20. Direkte Immunfluoreszenzfärbung in der Zellkultur

Für die nähere Charakterisierung HE-ähnlicher Strukturen während der OP9 Kokultur wurde die Expression endothelspezifischer Zelloberflächenmarker untersucht. Direkt konjugierte AK (VE-Cadherin (VE-cad)-PE; CD31-PE) wurden für 30 min bei 37°C mit einer Konzentration von [0,5 µg/ml] zu den lebenden Zellen pipettiert. Danach wurden die Zellen 1-mal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

2.2.21. Färbung von Endothelzellen mit DilAcLDL

Endothelzellen haben die Fähigkeit acetyliertes *Low-Density-Lipoprotein* (AcLDL) spezifisch über Rezeptoren aufzunehmen. Über eine Fluoreszenz-Markierung mit Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3, 3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), einem lipophilen Membranfarbstoff, kann die Aufnahme von AcLDL in die Zelle fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Charakterisiert wurden Endothelkolonien, die sich während der Differenzierung von ESZ auf OP9-Zellen gebildet hatten. Die Färbung erfolgte mit [0,5 µg/ml] DilAcLDL im STFV-Medium bei 37°C, 5% CO₂ für 8 Std. Nicht endozytiertes AcLDL wurde durch zweifaches Waschen von den Zellen entfernt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. RNA Isolierung aus Zellen

Die Gesamt-RNA Isolierung aus ESZ-abgeleiteten Zellen wurde unter Einsatz von TRIzol (Invitrogen) und des RNeasy™ Mini Kits (Qiagen) durchgeführt. TRIzol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiozyanat und wurde erstmals 1987 von Chomczynski und Sacchi [Chomczynski and Sacchi 1987] für die RNA Isolierung in einer Einzelschrittmethode beschrieben. RNA kann mit Hilfe von TRIzol und Chloroform spezifisch aus der wässrigen Phase isoliert werden, wohingegen DNA und Proteine in der Interphase bzw. organischen Phase zu finden sind. Wenn nicht

anders beschrieben, wurden die Zellen zuvor trypsinisiert, 1-mal mit PBS gewaschen, im Casy[®] gemessen und 1×10^6 Zellen in 1 ml TRIzol aufgenommen und lysiert. Nach der Zelllyse wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Probe für 15 Sekunden per Hand geschüttelt. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur für zwei bis drei Minuten inkubiert und dann für 15 min bei 4°C, 12000xg zentrifugiert (Heraeus Fresco 21 Zentrifuge). Durch die entstehende Phasentrennung konnte die RNA aus der wässrigen Phase entnommen und in ein neues RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Im nächsten Schritt wurde ein Volumen 70%-iger Ethanol zur wässrigen Phase gegeben, gemischt und auf die RNeasy Säule (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen) pipettiert. Alle weiteren Wasch- und Reinigungsschritte auf der RNeasy[®] Säule wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Eluierung der RNA erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser mit anschließender Quantifizierung im Spektrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Die Bestimmung der RNA Konzentration basiert auf der Absorption der Nukleobasen bei 260 nm. Den Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration beschreibt das Lambert-Beer'sche Gesetz: $A(\lambda) = \epsilon(\lambda) * c * d$

$A(\lambda)$: Absorption bei Wellenlänge λ

$\epsilon(\lambda)$: molarer Absorptionskoeffizient bei entsprechender Wellenlänge

c: Konzentration [mol L⁻¹]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Bei 260 nm wird von folgender Nukleinsäurekonzentration ausgegangen:

doppelsträngige- (ds) DNA 50 µg/ml

RNA 40 µg/ml

Verunreinigungen durch Salze und/oder organische Lösungsmittel bei OD230 nm sowie Proteine bei OD280 nm lassen sich über den Quotienten aus $\frac{260 \text{ nm}}{230 \text{ nm}}$ bzw. $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$ bestimmen. Eine Ratio von 1,8 – 2,2 bzw. von ca. 2,0 spricht für eine saubere RNA Probe.

2.3.2. cDNA Synthese

Nach erfolgter Reinheitsbestimmung wurde die RNA in komplementäre DNA, sogenannte cDNA umgeschrieben, die anschließend als Vorlage in der *Real Time-PCR* eingesetzt wurde. Das verwendete QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen beinhaltet einen gDNA Wipeout Puffer zur Eliminierung genomischer DNA und eine Reverse Transkriptase, die neben der RNA-abhängigen DNA Polymerase Aktivität eine RNase H Funktion hat, wodurch spezifisch RNA aus RNA:cDNA Hybriden abgebaut wird. Der Einsatz von Oligo-dT- und unspezifischen Primer ermöglicht die Transkription der kompletten RNA in cDNA auch im Bereich der 5' Region. Als Ausgang für die cDNA Synthese wurde 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl umgeschrieben und anschließend mit Wasser auf 480 µl aufgefüllt (1:25 Verdünnung). Um eine mögliche Kontamination durch genomische DNA nach RNA Isolierung ausschließen zu können, wurde für jede Probe eine Kontrolle (- RT) mitlaufen gelassen, die bis auf die Reverse Transkriptase alle Zusätze (RNA, Wipeout Puffer, RT Puffer, Primer, Wasser) beinhaltet.

2.3.3. Entwurf von Desoxyoligonukleotid-Primern

Für die qRT-PCR verwendete Primer wurden mit Hilfe von Primer-Blast (Primer3 und Blast) von NCBI generiert [Ye *et al.* 2012]. Das Programm verbindet die Module Primerdesign und Spezifitätskontrolle, um zielgenspezifische Primerpaare zu designen. Folgende Regeln wurden dabei beachtet:

- Das PCR Produkt sollte eine Länge von 100 – 150 bp haben
- Die Primerlänge sollte zwischen 22 und 25 bp liegen
- Um genomische DNA ausschließen zu können, wurden die Primerpaare nach Möglichkeit über eine Exon/Exon Grenze gelegt
- Der GC Inhalt sollte zwischen 40 und 60 % liegen
- Die Schmelztemperatur der Primer sollte zwischen 60 und 65 °C liegen

Ausgewählte Primerpaare wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und anschließend die Effizienz (E) mit dem *Real-Time* PCR Detection System (CFX96,

BIO RAD) bestimmt. Für die Evaluierung der Reaktionseffizienz wurde von jedem Primerpaar eine Standardkurve durch verschiedene Verdünnungsstufen einer repräsentativen cDNA Probe bestimmt. Die CFX Manager Software (BIO RAD) kalkuliert die Effizienzbestimmung und Normalisierung nach Pfaffl [Pfaffl 2001] und Vandesompele *et al.* [Vandesompele *et al.* 2002]. Eine Effizienz von 2 entspricht einer optimalen Verdopplung in jedem Zyklus und ist in der Software mit einer Effizienz von 100% gleichzusetzen (siehe Formel 2).

$$E = 10^{\left[-\frac{1}{\text{Steigung}}\right]}; \% \text{ Effizienz} = (E - 1) \times 100 \quad (2)$$

Desweiteren sind auch Primerpaare von der Firma Qiagen (QuantiTect Primer Assays) für die RT-PCR verwendet worden.

2.3.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)

qRT-PCR Analysen wurde in einem Real-Time PCR Thermozykler (C1000™ Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time PCR Detection System) unter den in Tabelle 8 beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt und ausgewertet.

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR für 40 Zyklen

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
Denaturierung	95°C	10 Sekunden
Annealing und Extension	60°C	30 Sekunden

Die Echtzeit PCR ist besonders geeignet für die Analysen von Genexpressionsmustern. Die Quantifizierung der PCR Produkte basiert auf der Fluoreszenzmessung von Fluorochromen nach jedem Zyklus. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green aus dem QuantiFast SYBR Green PCR Kit von Qiagen verwendet, der spezifisch an doppelsträngige (ds) DNA bindet. Zur Identifizierung von Biomarkern, wurde zunächst die RNA (Abschnitt: 2.3.1) isoliert, in cDNA umgeschrieben (Abschnitt: 2.3.2) und diese in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (beinhaltet die HotStarTaq®Plus

DNA Polymerase), 10 ng cDNA und 250 nM Primer (je *forward* und *reverse*) in der Echtzeit PCR eingesetzt. Während jedes Zyklus werden die fluoreszierenden Signale detektiert, gegen die Anzahl der gemessenen Zyklen aufgetragen und der Cq-Wert (*quantification cycle*, Schwellenwert-Zyklus) ermittelt. Der Cq-Wert bestimmt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Neben der bereits beschriebenen Primer-Effizienzbestimmung wird auch die Primerspezifität vor Beginn der eigentlichen Analyse ermittelt, um unspezifische Produkte ausschließen zu können. Dies erfolgte mittels Gel Elektrophorese und Schmelzkurven-Analyse. In der Gelelektrophorese wird nach Amplifikation eine dem Zielgen entsprechende Bande mit bestimmter Größe erwartet. Desweiteren wurde auch mit Hilfe der Schmelzkurven-Analyse, die sich direkt nach der Amplifikation anschließt, die Spezifität der Primerpaare analysiert. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung (55 °C bis 95°C; Inkrement 0,5°C) wird die DNA aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang und SYBR Green wird freigesetzt und detektiert. Wenn das Primerpaar ein spezifisches Produkt hervorbringt, ergibt sich eine Amplitude bei einer definierten Temperatur. Von der Software dargestellt wird die negative Regression nach Auftreten des ersten starken Fluoreszenzsignals ($-d(RFU)$) gegen die Temperatur (dT). Um eventuelle Unterschiede in der Gesamtmenge der RNA von verschiedenen Proben zu berücksichtigen, werden die Expressionswerte der Zielsequenz jeder Probe durch die gleichzeitige Amplifizierung eines Referenzgens (*housekeeper*) normiert. Diese relative Quantifizierung erfolgte mit Referenzgenen, die in allen Zellen und Geweben zu jeder Zeit und nach jeder Behandlung in etwa gleichem Maße exprimiert werden. Für die Normalisierung wurden zwei Referenzgene verwendet und für die Berechnung des $\Delta\Delta Cq$ -Wertes herangezogen (Formel 3).

$$x \text{ fache Expression } (\Delta\Delta Cq) = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta Cq \text{ Zielgen (Kontrolle-Probe)}}}{E(\text{Referenz})^{\Delta Cq \text{ Referenz (Kontrolle-Probe)}} \times (\text{Ref } n)^{\frac{1}{n}}} \quad (3)$$

Bei der Auswahl der Referenzgene (β -Actin, Gapdh) wurde darauf geachtet, dass diese nach Verwendung von transduzierten und nicht-transduzierten ESZ, nach Induktion (Doxozyklin (DOX), 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)) und im Verlauf verschiedener Differenzierungsstadien, gleich exprimiert werden. Als zusätzliche Kontrolle wurde auch die NTC (*no template control*) mitgeführt, um Kontaminationen und Primer-Dimer Verbindungen ausschließen zu können.

2.3.5. Statistik

Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz wurde über den *students* t-Test, für ungepaarte, zweiseitige Datensätze mit Hilfe von GraphPad Prism 5 berechnet. Als signifikant unterschiedlich wurde ein P-Wert < 0,05 bezeichnet.

2.3.6. EDV-Programme/Software

Durchflusszytometrische Messdaten wurden mit Hilfe der Kaluza- oder FlowJo X7.2.1 Software ausgewertet. Zur Auswertung mikroskopischer Aufnahmen wurde das Programm Zeiss Axio Vision 4.8 verwendet. Für molekularbiologische Ansätze wurde Geneious 6.1.6 genommen und für qRT-PCR Analysen das Bio-Rad CFX Manager Programm benutzt. Die Aufarbeitung generierter Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2007 oder mit GraphPad Prism 5.

3. Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zur HOXB4 Aktivität während der hämatopoetischen Differenzierung mit Hilfe verschiedener ESZ-Linien beschrieben.

3.1. HOXB4 beeinflusst die Entstehung Endothel-ähnlicher Kolonien und expandiert hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen während der Differenzierung embryonaler Stammzellen

Um die Wirkung einer ektopten HOXB4 Expression auf die Entstehung von HSPZ zu untersuchen, wurden retroviral transduzierte Zellen einer etablierten ESZ-Linie (CCE) differenziert. Mit CCE ESZ-abgeleiteten HOXB4⁺ HSPZ wurden bereits erfolgreich Transplantationsversuche in Mäusen durchgeführt [Pilat *et al.* 2005, Lesinski *et al.* 2012, Pilat *et al.* 2013]. Basierend auf diesen Erkenntnissen eigneten sich die CCE ESZ für alle aufbauenden Fragestellungen besonders gut. Die CCE ESZ wurden mit dem γ -retroviralen Expressionsvektor FMEV-eGFP oder FMEV-eGFP/HOXB4 transduziert und anschließend mittels eGFP Fluoreszenzsignal durchflusszytometrisch sortiert und als „Massenkultur“ kultiviert. Zu Beginn der Differenzierung exprimierten >90% der ESZ GFP (GFP, GFP/HOXB4) (Abb. 14A). Sie wurden für sechs Tage als EBs in Methylzellulose differenziert (EBd6) und nach Dissoziation für weitere fünf Tage mit OP9-Zellen kokultiviert (OP9d5). In Abb. 14B ist exemplarisch die Entstehung von zwei verschiedenen Suspensionsclustern dargestellt. Die Zellen sind rund, exprimieren eGFP/HOXB4 und lagern sich traubenförmig zusammen. Direkt unterhalb, oder den Suspensionszellen anliegend, haben sich wirbelartige Endothel-ähnliche Strukturen gebildet. Auch diese sind Derivate der differenzierenden GFP/HOXB4⁺ ESZ und lassen sich auf Grund ihrer plattenartigen und runden Morphologie sehr gut von den OP9-Zellen unterscheiden.

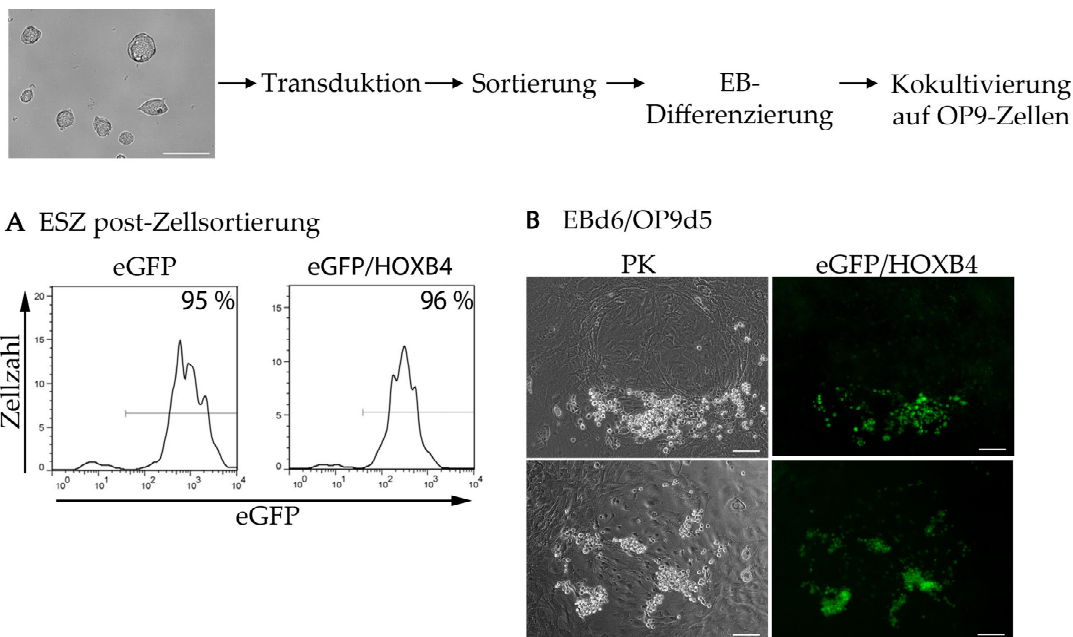


Abb. 14: Endothelkolonien und hämatopoetische Zellcluster treten gemeinschaftlich auf

ESZ (CCE) wurden zunächst mit FMEV-eGFP und FMEV-eGFP2AHOXB4 transduziert, nach eGFP Fluoreszenz sortiert, als EBs in Methylzellulose für sechs Tage differenziert und anschließend im STFV-Medium mit OP9-Zellen für 5 Tage kokultiviert. **(A)** Prozentualer Anteil von GFP⁺ Zellen nach Zellsortierung. **(B)** Aufnahmen von eGFP/HOXB4⁺ Suspensionszellen im Phasenkontrast (PK) und mit Fluoreszenz (Maßstabsbalken: 100 µm) am Tag 5 auf OP9-Zellen. Abk.: eGFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*.

3.1.1. ESZ-abgeleitete Suspensionszellen exprimieren den frühesten hämatopoetischen Oberflächenmarker CD41

Die ESZ-abgeleiteten Suspensionszellen wurden auf die Expression des hämatopoetischen Oberflächenmarkers CD41 (Integrin alpha 2 beta) untersucht. Da die Expression von CD41 den Beginn der Hämatopoese im Maussystem markiert, wurde die Antigenexpression von CD41 über 2 Tage in der Zellkulturschale auf Einzelzellebene untersucht. Aus dem vorherigen Experiment wurde deutlich, dass erste Suspensioncluster am Tag 5 auf OP9-Zellen mikroskopisch detektiert werden können. Aus diesem Grund wurde ab Tag 5 alle 15 min mit einer 100x Vergrößerung eine Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme mit eGFP/HOXB4⁺ Zellen durchgeführt. Abb. 15 zeigt einige ausgewählte Zeitpunkte (6 Std., 15 Std., 20 Std., 34 Std.). Dargestellt ist eine einzelne Suspensionszelle, die eGFP/HOXB4 und CD41 exprimiert. Am Anfang war die Expression von CD41 nur sehr schwach. Im Verlauf

der 2-tägigen Messung nahm die Intensität von CD41 mit jeder Zellteilung zu. Gleichzeitig haben sich die Zellen auch nach jeder Teilung wieder als Zellcluster zusammengefunden.

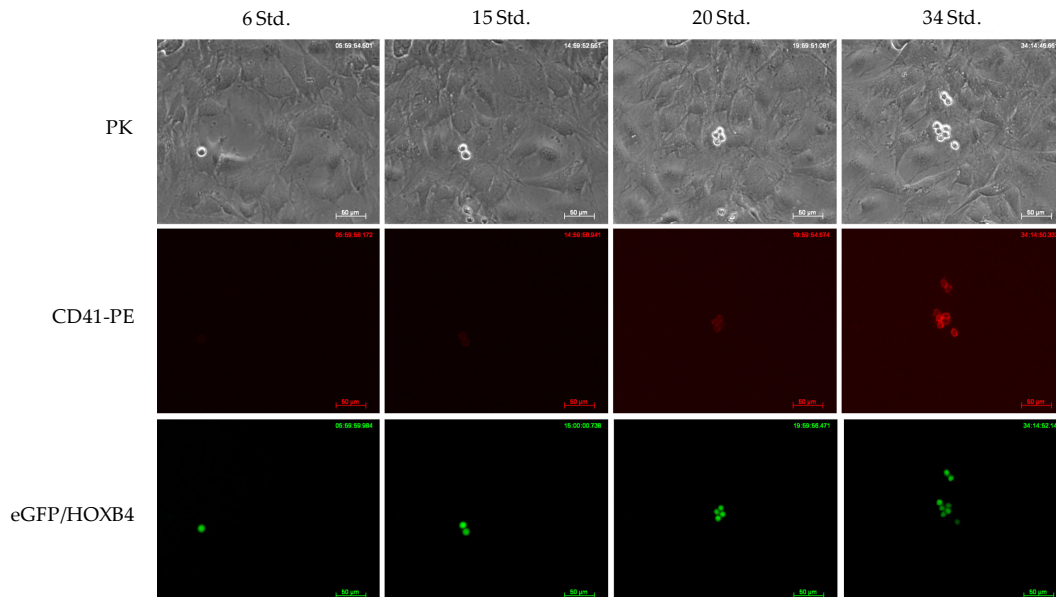


Abb. 15: Entstehung von CD41⁺ Zellen aus ESZ

Mit FMEV-eGFP2AHOXB4 transduzierte ESZ (CCE) wurden auf OP9-Zellen differenziert und am Tag 5 die Entstehung früher HSPZ auf Einzelzellebene dokumentiert. Die Zeitrafferaufnahmen erfolgten alle 15 min für insgesamt 2 Tage mit einem inversen Zeiss Fluoreszenzmikroskop unter konstanten Zellkulturbedingungen (5% CO₂, 21% O₂, 37°C,) mit einer 100x Vergrößerung. Dargestellt sind folgende Zeitpunkte: (6 Std., 15 Std., 20 Std., 34 Std.). Für die Immunfärbung früher HSPZ wurde ein PE-konjugierter CD41 AK [20 ng/ml] verwendet. Maßstabsbalken: 50 µm. Abk.: PK: Phasenkontrast; PE: Phycoerythrin.

Um das Proliferationsverhalten HOXB4⁺CD41⁺ HSPZ über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, wurden die Zellen für 28 Tage auf OP9-Zellen kultiviert und am Tag 8, 14 und 28 auf die Expression von CD41 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 16). Zum Vergleich ektop HOXB4 exprimierender Zellen wurden nicht-transduzierte und nur mit eGFP-transduzierte Zellen mitgeführt und der prozentuale Anteil von CD41⁺GFP⁺ Zellen nach Ausschluss der OP9-Zellen über deren Größe und Granularität (SSC/FSC) gemessen. Wie zu erwarten war, nahm der Anteil CD41⁺ Zellen nur innerhalb der ektop exprimierenden HOXB4 Zellfraktion zu. Nach 28 Tagen waren bereits 82% der Zellen CD41⁺HOXB4⁺. In den Kontrollen konnte ein derartiger Wachstumsvorteil der Zellen nicht beobachtet werden. Nach 8 Tagen Kokultivierung waren dort keine CD41⁺ Zellen mehr detektierbar. Aufbauend

auf diesen Ergebnissen sollte die Frage geklärt werden, ab welchem Zeitpunkt HOXB4 bereits einen fördernden Einfluss auf die hämatopoetische ESZ-Differenzierung hat.

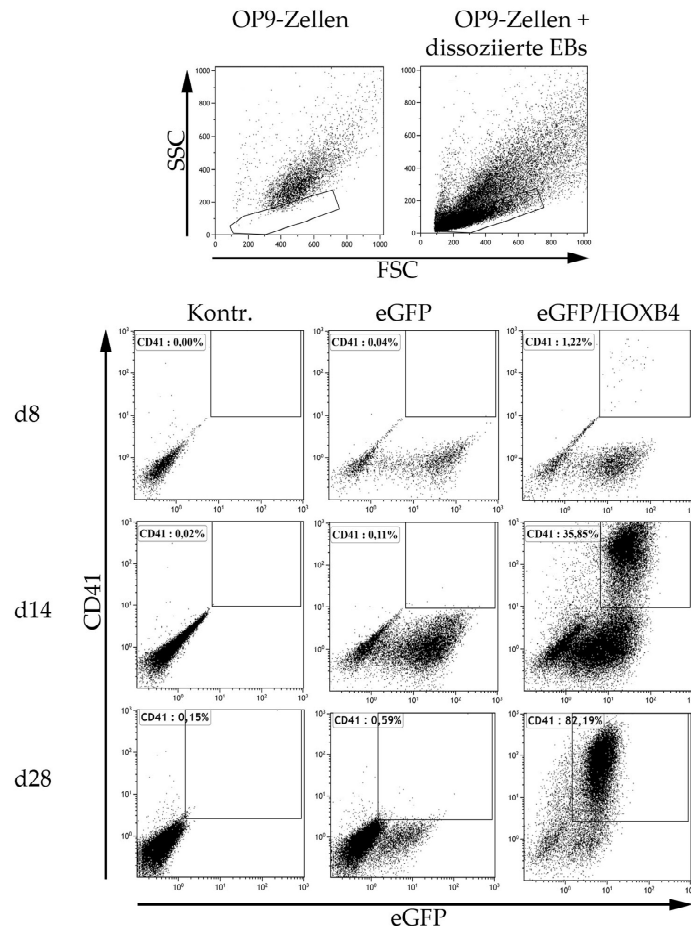


Abb. 16: Expression von CD41 in HOXB4⁺ Zellen

CCE ESZ-abgeleitete HSPZ wurden auf die Expression des hämatopoetischen Oberflächenmarkers CD41 am Tag 8, 14 und 28 während der Kultivierung auf OP9-Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Im SSC/FSC Plot konnten die HSPZ von den OP9-Zellen getrennt werden. Ermittelt wurde der prozentuale Anteil von CD41⁺HOXB4⁺ Zellen. Kontr. = nicht-transduzierte Zellen.

3.1.2. Entstehung Endothel-ähnlicher Kolonien

Das Differenzierungsprotokoll, das in der 2. Differenzierungsphase eine Kokultivierung der dissoziierten Tag 6 EB-Zellen mit OP9-Zellen vorsieht, erwies sich für die hier gestellte Fragestellung als besonders vorteilhaft. Neben der Entstehung von CD41⁺ HSPZ haben sich auch Endothel-ähnliche Kolonien während der hämatopoetischen Differenzierung gebildet (Abb. 17). Sie haben mit der rund erscheinenden Morphologie und der plattenartigen Struktur ein sehr

charakteristisches Aussehen und erinnern an das hämogene Endothel (HE), aus dem während der Embryonalentwicklung definitive hämatopoetische Zellen hervorgehen [Eilken et al. 2009]. Am Tag 2 der Differenzierung auf OP9-Zellen konnten die ersten Zellen, die sich wirbelartig vergrößerten, identifiziert werden. Abb. 17 zeigt exemplarisch Größe und Morphologie der Kolonien am Tag 5 der Kokultivierung. Zellen, die ektop HOXB4 exprimierten, zeigten neben der Bildung plattenartiger Kolonien auch auffällig viele anliegende Suspensionszellen (Abb. 14B, Abb. 17f).

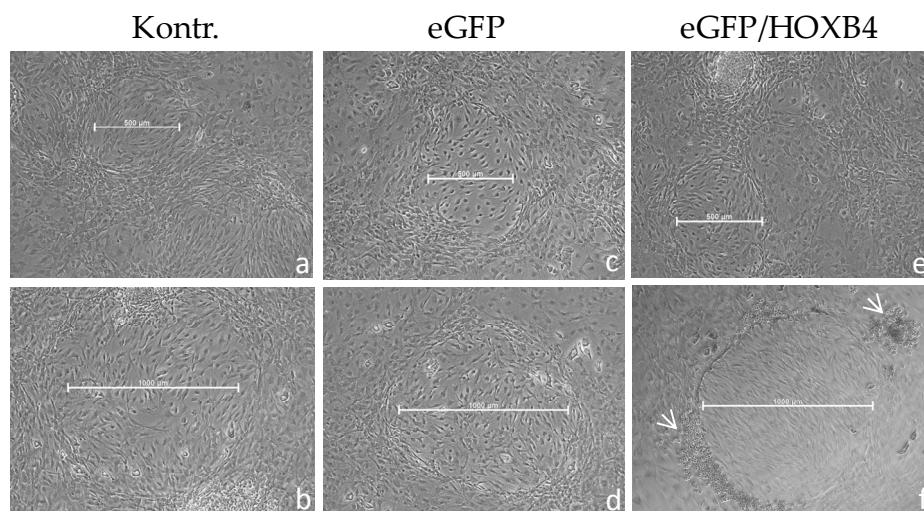


Abb. 17: Morphologie endothelialer Kolonien

1×10^5 dissoziierte Tag 6 EBs von differenzierenden CCE ESZ (nicht-transduziert (Kontr.), FMEV-eGFP, FMEV-eGFP/HOXB4) wurden für fünf Tage auf OP9-Zellen kultiviert und im Mikroskop nach Morphologie und Größe begutachtet. Die weißen Pfeilspitzen markieren Suspensionscluster (f).

3.1.3. Die Kolonien exprimieren Endothel-assoziierte Marker

Aufgrund der Ähnlichkeit der Kolonien mit Endothel-Strukturen wurde zunächst die Frage der Endothelabstammung geklärt. Dazu wurden die Kolonien immunphänotypisch nach der Expression von VE-cad und CD31 untersucht. Wie exemplarisch in Abb. 18 gezeigt, sind die Kolonien positiv für beide Endothel-assoziierten Oberflächenantigene. Gleichzeitig metabolisierten die Zellen auch DilAcLDL, das auf den endothelialen Ursprung dieser Kolonien hinweist.

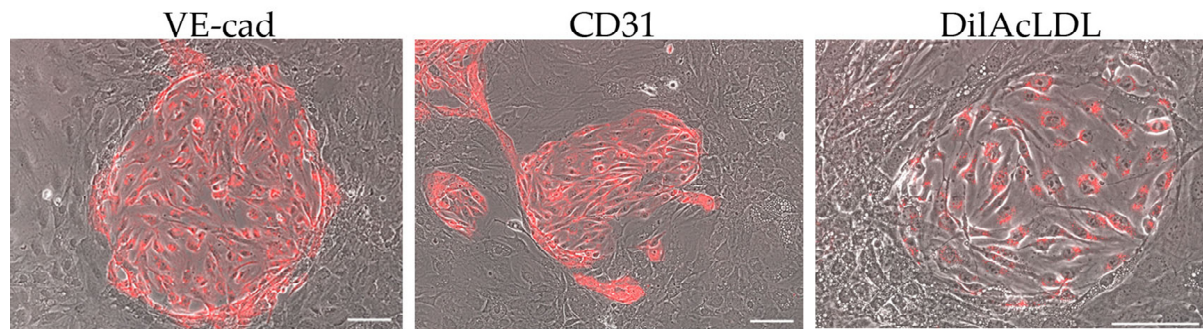


Abb. 18: Charakterisierung der Kolonien als Endothelium

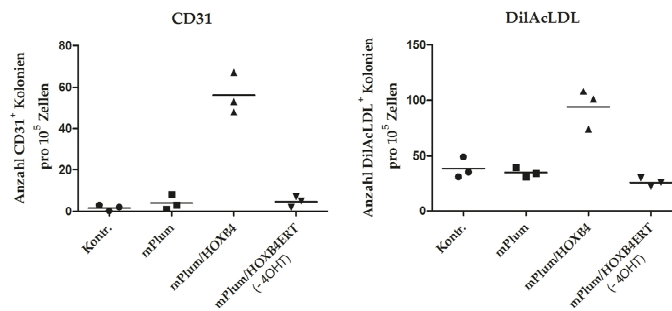
Dissoziierte d6EBs wurden für 3 Tage mit 1×10^5 Zellen auf OP9-Zellen kultiviert. Die wirbelartigen Kolonien wurden auf die Expression von Endothel-assoziierten Markern (CD31, VE-cad) und der Metabolisierung von DilAcLDL untersucht. Dargestellt sind Overlay-Beispielaufnahmen von VE-cad-PE, CD31-PE und DilAcLDL exprimierender Endothelstrukturen, die aus mPlum/HOXB4 exprimierenden Zellen entstanden sind. Maßstabsbalken: 100 μm . Overlay: Phasenkontrast und überlagerte Fluoreszenz. Objektiv für VE-Cad: 10x; CD31: 10x; DilAcLDL: 20x.

3.1.4. HOXB4 erhöht die Anzahl HE-ähnlicher Kolonien

Ein wichtiges Indiz dafür, dass HOXB4 das hämatopoetische Entwicklungsprogramm in ESZ unterstützt, lieferte die Anzahl der Endothelkolonien. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Kolonien morphologisch und zusätzlich mittels VE-Cad, CD31 Expression und Aufnahme von DilAcLDL von den OP9-Zellen unterschieden werden konnten, wurden diese als nächstes quantifiziert. Abb. 19A zeigt die Anzahl von CD31⁺ und DilAcLDL⁺ Endothelstrukturen. Eine ektope Expression des Transkriptionsfaktors HOXB4 führte bei den CCE-Zellen zu einer deutlich höheren Anzahl an Endothelkolonien im Vergleich zu nicht-transduzierten (Kontr.) und transduzierten (mPlum, mPlumHOXB4ERT (- 4-OHT)) Kontrollen. Diese Beobachtung bestätigte sich auch mittels durchflusszytometrischer Detektion der Oberflächenantigene VE-cad, Flk1, CD31 und der Aufnahme von DilAcLDL in der Gesamtkultur (+ OP9-Zellen) (Abb. 19B). Die OP9-Zellen wurden wie in jeder hier aufgeführten Differenzierung für jede Probe zur gleichen Zeit und mit der gleichen Menge pro 6 Well ausgesät, sodass sie mit Beginn der Kokultivierung konfluent waren. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl kann man davon ausgehen, dass der Anteil der OP9-Zellen in jeder

Probe gleich ist. Die Vergleichbarkeit zwischen den Proben ist damit auch in den Experimenten ohne Ausschluss der OP9-Zellen gegeben.

A



B

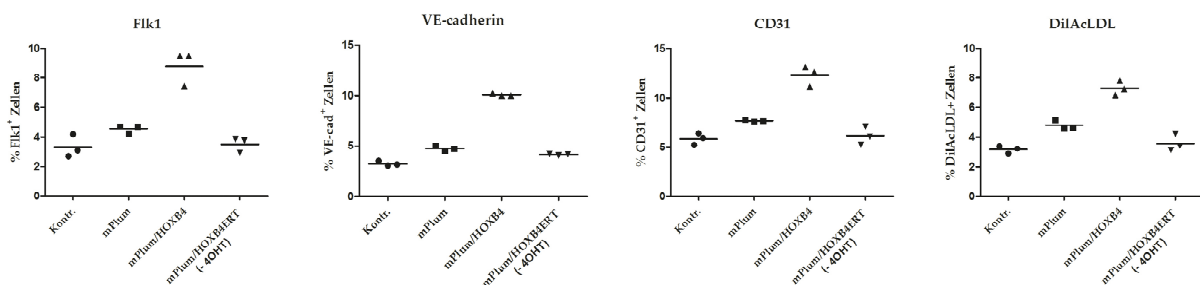


Abb. 19: Quantifizierung und prozentualer Anteil von Endothelstrukturen während der Kokultivierung mit OP9-Zellen

CCE-ESZ ohne (Kontr.) und mit FMEV-mPlum, -mPlum/HOXB4 und -mPlum/HOXB4ERT (-4-OHT) Transduktion wurden für sechs Tage als EBs differenziert und anschließend dissoziiert. 1×10^5 dissoziierte EB-Zellen wurden für weitere drei (A) bzw. fünf (B) Tage in STFV-Medium auf OP9-Zellen kultiviert und die endothelialen Kolonien mit Hilfe von CD31 und DilAcLDL ausgezählt (A) und der Anteil Flk1⁺, VE-cad⁺, CD31⁺ und DilAcLDL⁺ Zellen in der Gesamtkultur durchflusszytometrisch bestimmt (B). Dargestellt sind technische Replikate (n=3) und der arithmetische Mittelwert als horizontale Linie.

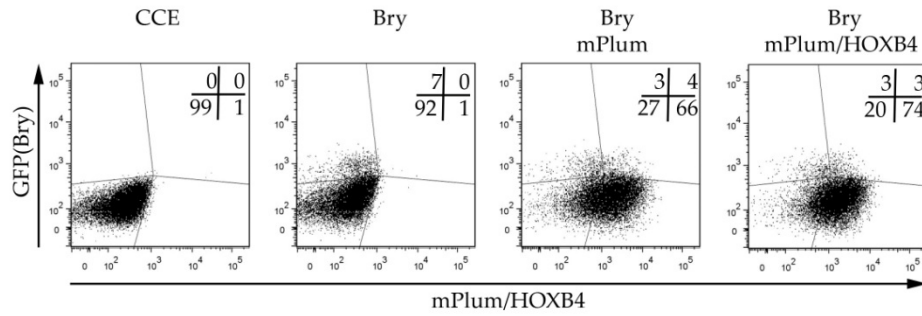
In den Proben mit konstitutiver HOXB4 Expression war der prozentuale Anteil Endothel-assoziiierter Marker erhöht (VE-cad, CD31, DilAcLDL). Weil Endothelzellen aus Flk1-exprimierenden Mesodermzellen entstehen, wurde auch die Flk1 Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte in den HOXB4 Kulturen anteilmäßig mehr Flk1⁺, VE-cad⁺, CD31⁺ und DilAcLDL⁺ Zellen gemessen werden.

3.2. Ektop exprimiertes HOXB4 verstärkt nicht die Mesodermspezifikation

Im vorherigen Abschnitt konnte unter Verwendung der CCE-ESZ bereits gezeigt werden, dass eine ektope HOXB4 Expression zu mehr Endothelkolonien führte. Ob der Grund dafür eine verstärkte Spezifikation in Richtung Mesoderm ist, sollte mit Hilfe einer Reporter ESZ-Linie (*Bry*^{GFP/+} ESZ) geklärt werden. Der Transkriptionsfaktor Brachyury (*Bry*) ist ein Indikator dafür, dass die Zellen in Richtung Mesoderm differenzieren. Die Expression von *Bry* wird für die Mesodermformation benötigt und hat aufgrund dessen einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Entstehung von Endothel- und hämatopoetischen Zellen während der Embryonalentwicklung. *Bry*^{GFP/+} ESZ wurden zu diesem Zweck mit FMEV-mPlum und -mPlum/HOXB4 transduziert. Zu Beginn der Differenzierung (d0) wurde in durchflusszytometrischen Analysen der Anteil an *Bry*⁺/mPlum⁺ Zellen bestimmt (Abb. 20A). Damit möglichst alle Zellen am Anfang noch einen pluripotenten Status haben, wurde die Differenzierung nur mit $\leq 10\%$ GFP(*Bry*)⁺ gestartet. Vor der Differenzierung waren weniger als 10% der Zellen GFP(*Bry*)⁺ und mehr als 70% mPlum⁺ bzw. mPlum/HOXB4⁺. Im Verlauf der 6-tägigen EB-Differenzierung wurden am Tag 1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5, 6 die EBs geerntet und der Anteil *Bry*⁺ Zellen analysiert (siehe Tabelle 9 und Abb. 20C). In Abb. 20B ist exemplarisch ein Phasenkontrastbild und die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme von GFP(*Bry*)⁺ d4 EBs von *Bry*^{GFP/+} mPlum/HOXB4-abgeleiteten ESZ dargestellt. Ein spezifisches Signal GFP(*Bry*)⁺ Zellen konnte ab Tag 2,5 bis 4,5 gemessen werden und erreichte am Tag 3,5 ein Maximum. In Tabelle 9 sind zusammenfassend alle Werte der Gesamtzellzahl von *Bry*⁺ Zellen zu den definierten EB Zeitpunkten und der jeweiligen Probe gegenübergestellt. Es konnte kein nennenswerter Unterschied in der zeitlichen Expression von *Bry* zwischen den Proben ermittelt werden. Eine ektope Expression von HOXB4 erhöhte zu keinem Zeitpunkt den Anteil *Bry*⁺ Zellen. Eine Verstärkung der Mesodermspezifikation durch eine ektope HOXB4 Expression ist nicht erkennbar.

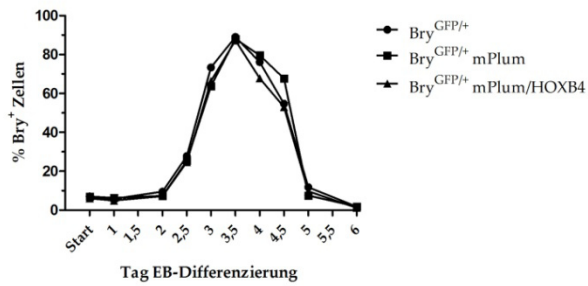
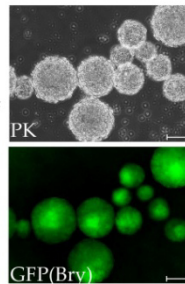
ESZ Brachyury^{GFP/+} → Transduktion → Sortierung → Kultivierung → Entfernung CF1-MEF

A: Start ESZ Differenzierung d0

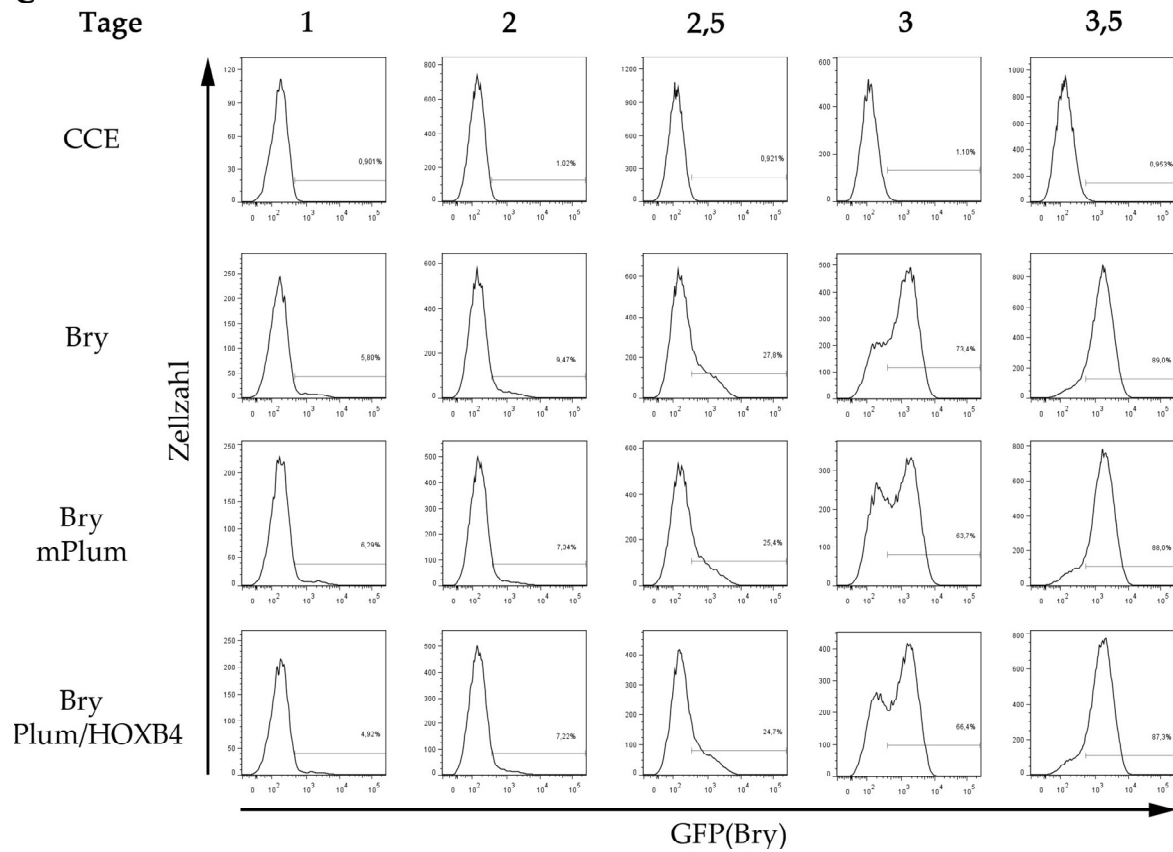


B: 6-tägige EB-Differenzierung

Bsp.: d4 EBs von Bry^{GFP/+} mPlum/HOXB4



C



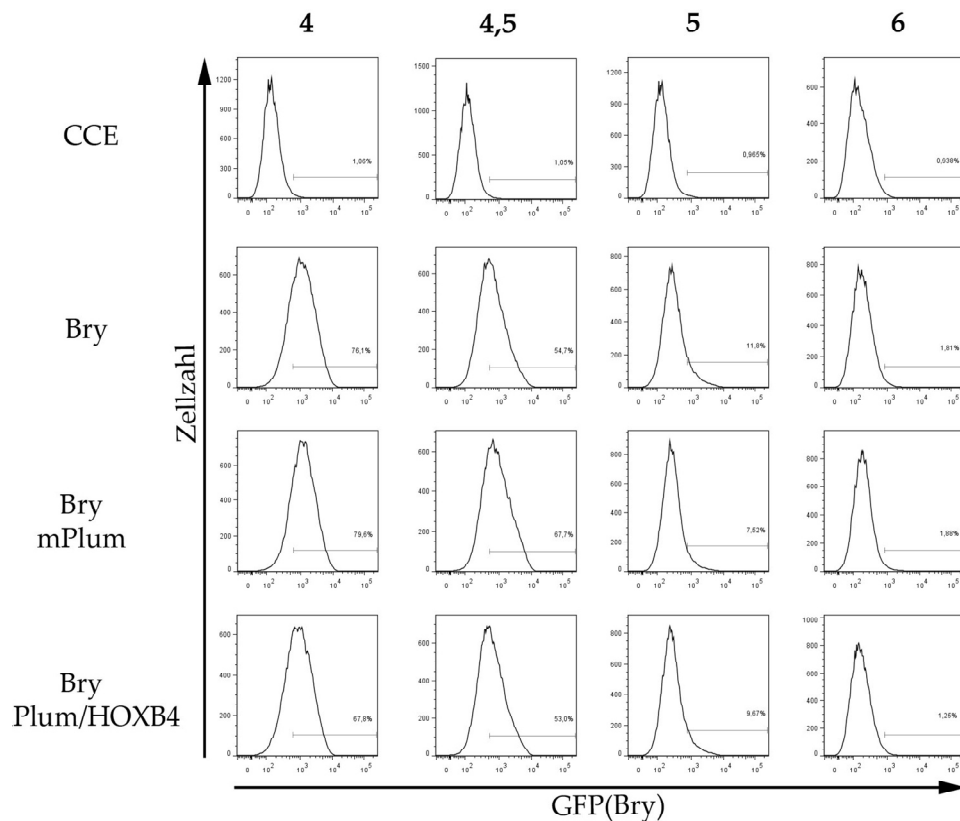


Abb. 20: Zeitverlauf der *Brachyury* Expression während der EB-Differenzierung

(A) *Brachyury*^{GFP/+} ESZ wurden mit einem retroviralen Vektor (mPlum, mPlum/HOXB4) transduziert und anschließend sortiert. Da diese ESZ im Gegensatz zu CCE ESZ auf CF1-MEF kultiviert wurden, mussten diese vor Beginn der Differenzierung mittels MACS entfernt werden. Nachfolgend wurden die ESZ in die 6-tägige EB-Differenzierung überführt. Der prozentuale Anteil GFP(*Bry*) und mPlum/HOXB4 exprimierender Zellen vor der EB-Differenzierung ist im rechten oberen FACS Plot gezeigt. (B) Zusammengefasst aus (C) ist der prozentuale Anteil *Bry* exprimierender Zellen gegen die Tage der EB-Differenzierung aufgetragen. Tag 4 mPlum/HOXB4⁺ EBs wurden als GFP(*Bry*) Expressionsbeispiel mikroskopisch aufgenommen. (C) Gemessen wurde die *Bry* Expression mittels durchflusszytometrischer Analysen an folgenden Tagen: Tag 1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6. Als GFP Negativkontrolle wurden CCE-ESZ ohne Transduktion mitgeführt. Sie dienten zur Einstellung der positiv/negativ Populationen. Als Fluoreszenzkontrolle wurden mPlum transduzierte *Bry*^{GFP/+} ESZ verwendet. Abk.: PK: Phasenkontrast.

Tabelle 9: Gesamtzellzahl *Bry*⁺ Zellen

Probe	Gesamtzellzahl	% <i>Bry</i> ⁺ Zellen	Anzahl <i>Bry</i> ⁺ Zellen
<i>Brachyury</i> ^{GFP/+}	Tag 1: 2,46x10 ⁵	5,8 %	1,42x10 ⁴
	Tag 2: 1,09x10 ⁶	9,5 %	1,03x10 ⁵
	Tag 2,5: 2,75x10 ⁶	27,8 %	7,64x10 ⁵
	Tag 3: 4,14x10 ⁶	73,4 %	3,04x10 ⁶
	Tag 3,5: 5,75x10 ⁶	89,0 %	5,12x10 ⁶
	Tag 4: 13,92x10 ⁶	76,1 %	1,06x10 ⁷
	Tag 4,5: 16,82x10 ⁶	54,7 %	9,2 x10 ⁶
	Tag 5: 40,39x10 ⁶	11,8 %	4,77x10 ⁶
	Tag 6: 42,22x10 ⁶	1,8 %	7,60 x10 ⁵

Probe	Gesamtzellzahl	% <i>Bry</i> ⁺ Zellen	Anzahl <i>Bry</i> ⁺ Zellen
<i>Brachyury</i> ^{GFP/+} mPlum	Tag 1: 1,61x10 ⁵	6,29 %	1,01x10 ⁴
	Tag 2: 3,32x10 ⁵	7,34 %	2,44 x10 ⁴
	Tag 2,5: 9,40x10 ⁵	25,4 %	2,39 x10 ⁵
	Tag 3: 3,03x10 ⁶	63,7 %	1,93 x10 ⁶
	Tag 3,5: 5,03x10 ⁶	88,0 %	4,43 x10 ⁶
	Tag 4: 3,64x10 ⁶	79,6 %	2,90 x10 ⁶
	Tag 4,5: 12,61x10 ⁶	67,7 %	8,54 x10 ⁶
	Tag 5: 37,36x10 ⁶	7,52 %	2,81 x10 ⁶
	Tag 6: 39,22x10 ⁶	1,88 %	7,37x10 ⁵
<i>Brachyury</i> ^{GFP/+} mPlum/HOXB4	Tag 1: 2,24x10 ⁵	4,92 %	1,10x10 ⁴
	Tag 2: 8,29x10 ⁵	7,22 %	5,99x10 ⁴
	Tag 2,5: 2,23x10 ⁶	24,7 %	5,51x10 ⁵
	Tag 3: 3,32x10 ⁶	66,4 %	2,20x10 ⁶
	Tag 3,5: 7,23x10 ⁶	87,3 %	6,31x10 ⁶
	Tag 4: 9,43x10 ⁶	67,8 %	6,39x10 ⁶
	Tag 4,5: 12,95x10 ⁶	53,0 %	6,86x10 ⁶
	Tag 5: 49,55x10 ⁶	9,67 %	4,79x10 ⁶
	Tag 6: 66,31x10 ⁶	1,24 %	8,22x10 ⁵

Wurden Tag 6 EBs aber weiter auf OP9-Zellen differenziert, konnte erneut eine Expansion von HOXB4⁺ HSPZ beobachtet werden. In Abb. 21 ist nach acht Tagen Differenzierung (EBd6/OP9d8) der prozentuale Anteil CD41⁺ und CD45⁺ Zellen im Konturplot gezeigt.

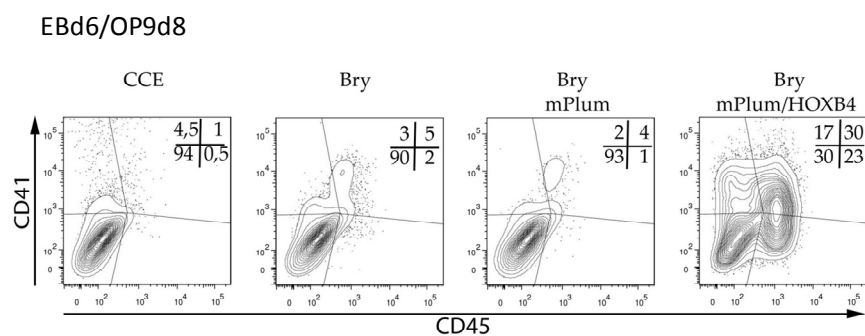


Abb. 21: Entstehung CD41⁺CD45⁺ Zellen aus *Brachyury*^{GFP/+} ESZ-HSPZ

Brachyury^{GFP/+} ESZ wurden für sechs Tage als EBs differenziert, anschließend dissoziiert und mit jeweils 1x10⁵ Zellen pro Vertiefung in eine 6er Flachbodenplatte ausgesät. Danach erfolgte die Kokultivierung mit OP9-Zellen für weitere acht Tage und die durchflusszytometrische Messung der Oberflächenmarker CD41 und CD45.

Wenn HOXB4 ekto exprimiert wurde entstehen über 40% hämatopoetische Zellen, die den frühesten hämatopoetischen Marker CD41 exprimieren und zu CD45⁺ Zellen

ausreifen (23%). In den Kontrollen entstehen dagegen maximal 2% CD41⁺CD45⁺ Zellen in der Gesamtkultur.

3.3. HOXB4 beeinflusst die Expression von *Runx1*

Der Transkriptionsfaktor *Runx1* ist für die Reifung hämatopoetischer Zellen von CD41⁺ zu CD41⁺CD45⁺ Zellen essentiell. Ohne *Runx1* Expression entstehen keine dHSZ aus hämogenen Endothelzellen (HE). Mit Hilfe der CCE ESZ konnte gezeigt werden, dass durch eine ektope Expression von HOXB4 mehr HE-ähnliche Kolonien entstehen. Mit *Bry*^{GFP/+}-abgeleiteten hämatopoetischen Zellen ist deutlich geworden, dass im Gegensatz zu den Kontrollen, ektope HOXB4 exprimierende HSPZ nicht nur selektiv expandieren, sondern auch in CD41-CD45⁺ Zellen ausreifen (Abb. 21). Deshalb stellte sich die Frage, ob *Runx1* und HOXB4 bei der HSZ-Entstehung kooperieren. Daher wurde im nächsten Schritt die Expression von *Runx1* unter Verwendung der Reporter *Runx1*^{Venus/+} ESZ-Linie im Verlauf der EB-Differenzierung und anschließenden Kokultivierung mit OP9-Zellen untersucht. Mit Hilfe der Venusfluoreszenz kann die *Runx1* Expression in den ESZ detektiert werden. Die CCE-ESZ wurden in allen Experimenten zur Einstellung der Venus Population verwendet.

3.3.1. Die initiale *Runx1* Expression ist während der EB-Differenzierung nicht HOXB4 abhängig

Runx1 markiert den Beginn der definitiven Hämatopoese. Die Expression von Flk1 kann sukzessiv von spezifizierten Mesodermzellen bis hin zur Entstehung von Endothelzellen nachgewiesen werden und wurde zusätzlich zum *Runx1* Reporterprotein Venus untersucht. Vor Beginn der EB-Differenzierung wurde der Anteil Venus(*Runx1*)⁺ Zellen bestimmt (Abb. 22A). Die Ausgangspopulation beinhaltete weniger als 3% Venus(*Runx1*)⁺ Zellen und mehr als 60% der Zellen, die mPlum (86%), mPlum/HOXB4ERT (- 4-OHT) (66%) bzw. mPlum/HOXB4 (75%) exprimierten. Während der EB-Differenzierung (d2-d6) konnte eine Venus(*Runx1*)

Expression ab Tag 4 in allen Proben detektiert werden. Flk1 ließ sich bereits ab Tag 2 nachweisen (Abb. 23).

ESZ: $Runx1^{Venus/+}$ → Transduktion → Sortierung → Kultivierung → Entfernung CF1-MEF

Start ESZ Differenzierung d0

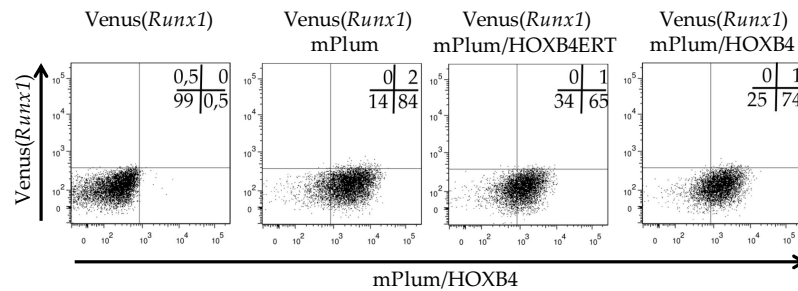


Abb. 22: Transduktion von $Runx1^{Venus/+}$ ESZ

Ausgangsexpression von mPlum/HOXB4 bzw. den Kontrollen Venus(*Runx1*) nicht transduziert und transduziert mit mPlum und mPlum/HOXB4ERT (- 4-OHT) in den $Runx1^{Venus/+}$ ESZ.

Der direkte Vergleich ektop HOXB4 exprimierender Zellen mit den Kontrollen (mPlum; mPlum/HOXB4ERT (- 4-OHT)) zeigte, dass die initiale *Runx1* und Flk1 Expression in HOXB4 Kulturen eher verzögert abläuft.

Tag 2-6 EB-Differenzierung

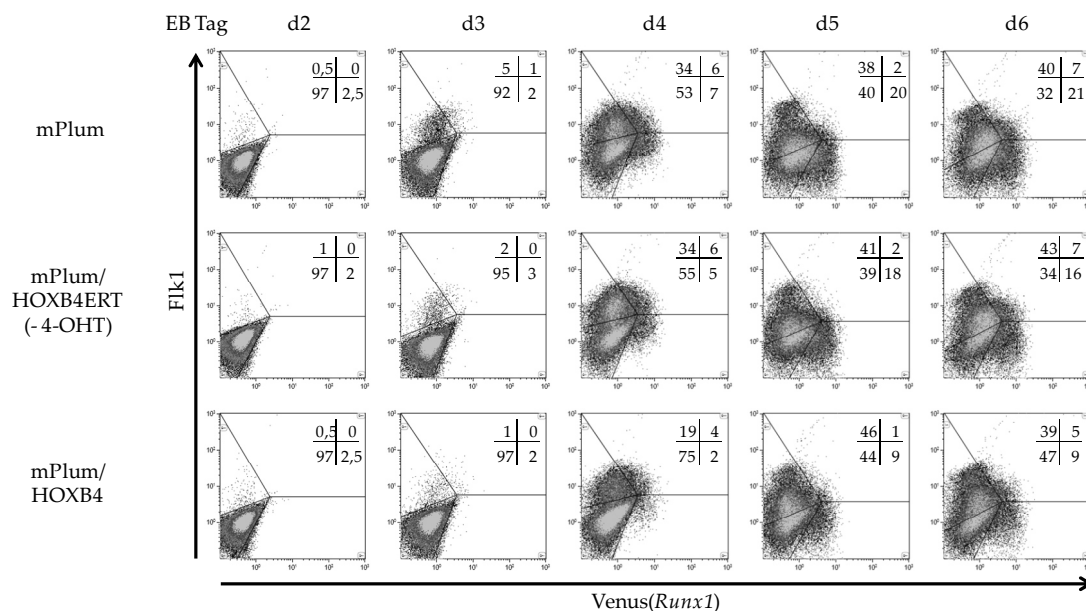


Abb. 23: Expressionsverlauf von *Runx1* und Flk1 während der EB-Differenzierung

Durchflusszytometrische Messung der *Runx1* und Flk1 Expression während der 6-tägigen EB-Differenzierung (d2-d6). Die Prozentwerte der Zellpopulation in den einzelnen Quadranten sind oben rechts im jeweiligen Plot aufgeführt.

Am Tag 4 waren nur 19% der Zellen Flk1⁺ und erreichten einen Tag später einen ähnlichen Prozentwert vergleichbar mit den Kontrollen. Auch die *Runx1* Expression ist am Tag 5 mit 9% um die Hälfte niedriger als bei den Kontrollen (mPlum: 20% und mPlum/HOXB4ERT: 18%). Es wurden am EB Tag 4 auch weniger Gesamttranskriptmengen von *Gata2* (3-fach) und *Scl/tal1* (3,6-fach) in FMEV-HOXB4 transduzierten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (mPlum) gemessen (Abb. 24).

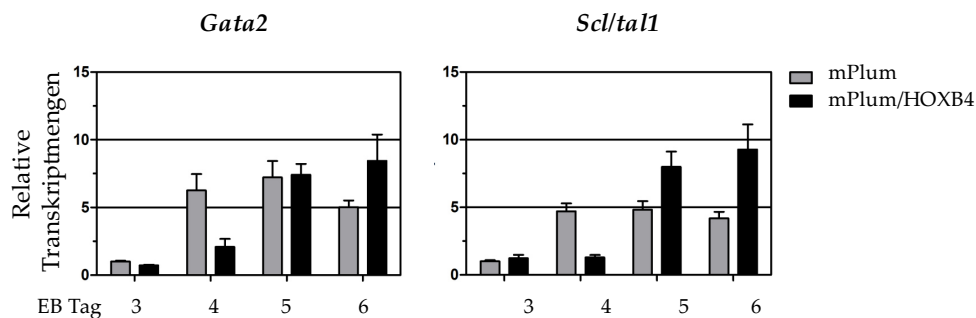


Abb. 24: Relative Transkriptmengen von *Gata2* und *Scl/tal1*

Im Verlauf der EB-Differenzierung (d3-d6) wurde mittels qRT-PCR die Expression von *Gata2* und *Scl/tal1* in *Runx1*^{Venus/+} Reporterzellen ermittelt. In grau ist die Expression von mPlum transduzierten Zellen dargestellt und in schwarz von mPlum/HOXB4 transduzierten Zellen. Die Werte wurden gegen die Referenzgene *Gapdh* und *Actb* normalisiert und in Bezug zu Tag 3 EB-Werten gesetzt. Es handelt sich dabei um technische Replikate n=3 +/- SD.

Nach längerer EB-Differenzierung ließen sich tendenziell größere Mengen der Transkripte beider Transkriptionsfaktoren in HOXB4 transduzierten Zellen nachweisen. Die zeitliche Verzögerung könnte dadurch erklärt werden, dass HOXB4 die Entwicklung einer Zellpopulation während der frühen EB-Differenzierung inhibiert. Nach 6-tägiger EB-Differenzierung wurden die EBs dissoziiert und auf OP9-Zellen kultiviert. Der unterstützende Einfluss von HOXB4 auf die Entstehung von hämatopoetischen Suspensionsclustern ließ sich auch mit diesen ESZ nachvollziehen. In Abb. 25 ist die Anzahl an Suspensionsclustern im Balkendiagramm dargestellt, die sich während der Differenzierung auf OP9-Zellen am Tag 4 gebildet hatten. Es entstanden ca. 5-mal mehr Cluster, wenn HOXB4 ektop exprimiert wurde. Mikroskopisch erscheinen die Zellen Venus(*Runx1*)⁺ (Abb. 25B).

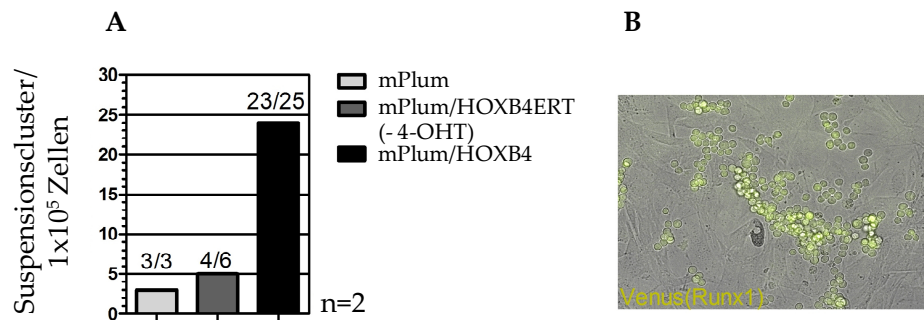


Abb. 25: Anzahl der Suspensionscluster auf OP9-Zellen

In Doppelbestimmung wurden pro Probe 1x10⁵ dissoziierte d6 EBs pro Vertiefung einer 6er Flachbodenplatte ausgesät und die Anzahl der Suspensionscluster am Tag 4 auf OP9-Zellen im Balkendiagramm dokumentiert (A). Ein Beispiel für *Runx1*⁺ Suspensionszellen von HOXB4 transduzierten Venus(*Runx1*)⁺ Zellen am Tag 6 auf OP9-Zellen ist in B dargestellt. 200x Vergrößerung eines PK-Fluoreszenz Mischbildes. Zeiss Filtersatz: 46 HE YFP (BP 500/25, FT 515, BP 535/30).

3.3.2. HOXB4 fördert die Entstehung einer Subpopulation mit erhöhter *Runx1* Expression (*Runx1*^{hi})

Während die *Runx1* Expression im Verlauf der EB-Differenzierung durch HOXB4 nicht initiiert oder erhöht wurde, zeigte sich zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung auf OP9-Zellen, dass in HOXB4 Kulturen eine Subpopulation entstand, die eine stärkere *Runx1* Expression aufwies (*Runx1*^{hi}) (Abb. 26).

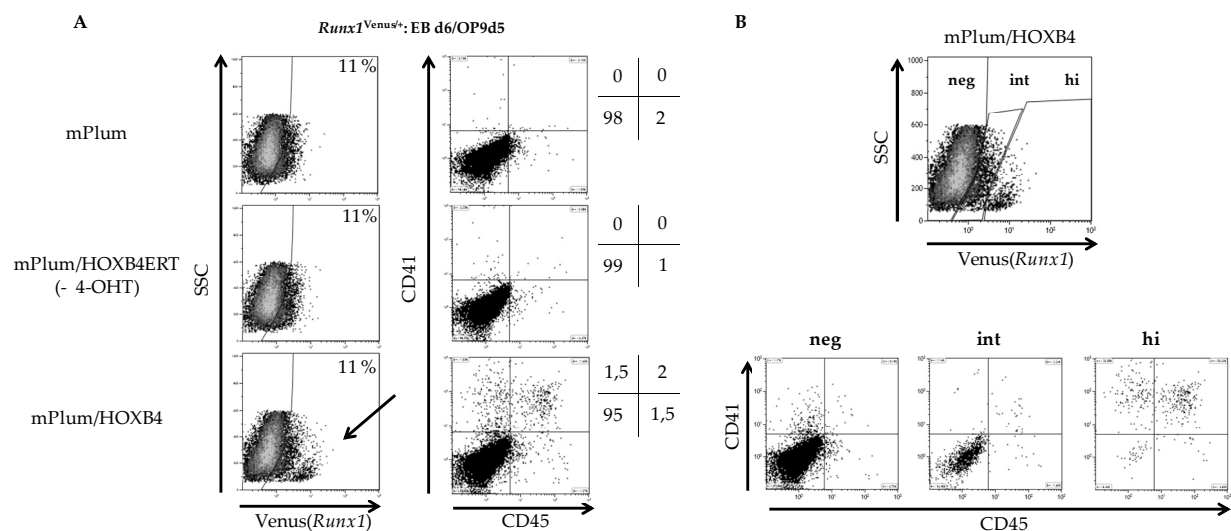


Abb. 26: HOXB4-vermittelte Entstehung einer *Runx1*^{hi} Subpopulation

(A) *Runx1*^{Venus⁺} Tag 6 EBs (mPlum, mPlum/HOXB4ERT (- 4-OHT), mPlum/HOXB4) wurden dissoziiert und für 5 Tage in STFV-Medium auf OP9-Zellen kultiviert. Am Tag 5 wurde die Gesamtpopulation durchflusszytometrisch auf die Expression der hämatopoetischen Oberflächenmarker CD41 (PE konjugiert) und CD45 (APC konjugiert) untersucht. (B) Bestimmung der CD41CD45 Expression in FMEV-mPlum/HOXB4 transduzierten Zellen nach Unterteilung in eine *Runx1*-negative (neg), intermediäre (int) und hoch exprimierende (hi)-Subpopulation.

Innerhalb der Gesamtpopulation waren in allen Proben 11% Venus(*Runx1*)⁺ Zellen nachweisbar. Abzüglich der OP9-Zellen (siehe Tabelle 10) errechnet sich eine geringfügig höhere Anzahl (ca. 1,3-fach) *Runx1* exprimierender Zellen in HOXB4 transduzierten Zellen, wahrscheinlich durch eine beginnende Expansion der *Runx1*^{hi} Zellen bedingt.

Tabelle 10: Gesamtzellzahl von Venus(*Runx1*)⁺ Zellen

Probe	Vitalität %	Gesamtzellzahl	Zellzahl abzüglich OP9-Zellen	% Venus ⁺ Zellen	Zellzahl Venus ⁺ Zellen (- OP9-Zellen)
OP9-Zellen	92,4	9,56x10 ⁵			
mPlum	93,3	1,94x10 ⁶	9,84x10 ⁵	11	1,08x10 ⁵
mPlum/ HOXB4ERT	93,2	1,91x10 ⁶	9,54x10 ⁵	11	1,05x10 ⁵
mPlum/ HOXB4	93,6	2,19x10 ⁶	1,23x10 ⁶	11	1,35x10 ⁵

Die Unterschiede in der Expression von *Runx1* korrelierten auch mit der Entstehung von CD41⁺CD45⁺ HSPZ (Abb. 26A, B). Eine Unterteilung der Kulturen in eine *Runx1*-negative (neg), intermediäre (int) und höher exprimierende (hi) Fraktion deutete stark darauf hin, dass das hämatopoetische Potenzial hauptsächlich in der *Runx1*^{hi} Fraktion lag. Diese Ergebnisse erklären wahrscheinlich auch die erhöhte Anzahl an Suspensionsclustern in ekto HOXB4 exprimierenden Zellen, die im Mikroskop starke Venusfluoreszenz aufwiesen (Abb. 25).

3.3.3. HOXB4 steigert die Expression von *Runx1* in einer Subpopulation von Zellen die bereits *Runx1* exprimieren

Nachfolgend sollte die Frage geklärt werden, ob die *Runx1*^{hi} exprimierenden Zellen aus *Runx1*^{neg}- oder aus *Runx1*^{int} Zellen hervorgehen. Hierfür wurden Tag 6 EBs dissoziiert, sortiert (Abb. 27A exemplarisch für mPlum/HOXB4 Tag 6 EBs dargestellt) und die in Tabelle 11 aufgelisteten Zellzahlen und Subpopulationen für eine 5-tägige Differenzierung auf OP9-Zellen eingesetzt (Abb. 27B, C, D, E). Es wurden Tag 6 EBs gewählt, da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine *Runx1*^{hi} exprimierenden Zellen nachweisbar waren (Abb. 23). In das Medium von HOXB4ERT transduzierten Zellen wurde zusätzlich 4-OHT zugegeben, damit HOXB4 vom Zytoplasma in den Kern

gelangen kann (Abb. 27C(b-d), D(g-j)). Es wurden von allen Proben nicht sortierte Tag 6 EB-Zellen (definiert als Gesamtpopulation) und nach Venus(*Runx1*)^{neg} und Venus(*Runx1*)^{pos} sortierte Subpopulationen für fünf Tage auf OP9-Zellen differenziert.

Tabelle 11: Eingesetzte Zellzahl Venus ^{+/-} Tag 6 EBs

<u>Proben</u>	Gesamt-population	4-OHT [nM]	Sortierung Venus ^{neg} Fraktion	4-OHT [nM]	Sortierung Venus ^{int} Fraktion	4-OHT [nM]
Kontr.	100.000	/	234.934	/	2.191	/
mPlum	100.000	/	240.543	/	2.111	/
mPlum/HOXB4	100.000	+/- 100	263.577	/	2.698	/
mPlum/HOXB4 ERT	100.000	0, 10, 50,100	289.297	0, 10, 50, 100;	1.780	100

Nach fünf Tagen Kokultur wurden alle Zellen geerntet (OP9-Zellen + HZ) und mit einem Anti CD41-PE-konjugierten AK gefärbt. Ohne HOXB4 sind in den Kontrollen (Kontr., mPlum, mPlumHOXB4ERT) weder aus der *Runx1*^{neg} noch aus der *Runx1*^{int} sortierten Ursprungsfraction *Runx1*^{hi} Zellen entstanden (Abb. 27B,C). Nur wenn HOXB4 durch Zugabe von 4-OHT in den Kern transportiert werden konnte (Abb. 27D) oder konstitutiv exprimiert wurde (Abb. 27E) und zusätzlich eine Grundhöhe an *Runx1* Expression gegeben war (Gesamtpopulation und *Runx1*^{int} Sortpopulation), hat sich eine *Runx1*^{hi} Population entwickelt, die auch gleichzeitig CD41^{hi} exprimierte (D(g-j), E(l-n)). Aus *Runx1*^{neg} sortierten, konstitutiv HOXB4 exprimierenden Zellen sind nur CD41^{lo} Zellen entstanden (Abb. 27(k)). Um Unterschiede in der Anzahl an Suspensionsclustern mit verschiedenen 4-OHT Konzentrationen zu identifizieren, wurden diese ausgehend von der Gesamtpopulation gezählt. Mit [100 nM] 4-OHT haben sich die meisten hämatopoetischen Cluster entwickelt (Abb. 27D, grün). Für alle weiteren Experimente wurde die gleiche Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse deuten auf eine synergistische Aktivität von *Runx1* und HOXB4 hin, die zusammen das hämatopoetische Programm über eine *Runx1*^{hi} Subpopulation regulieren.

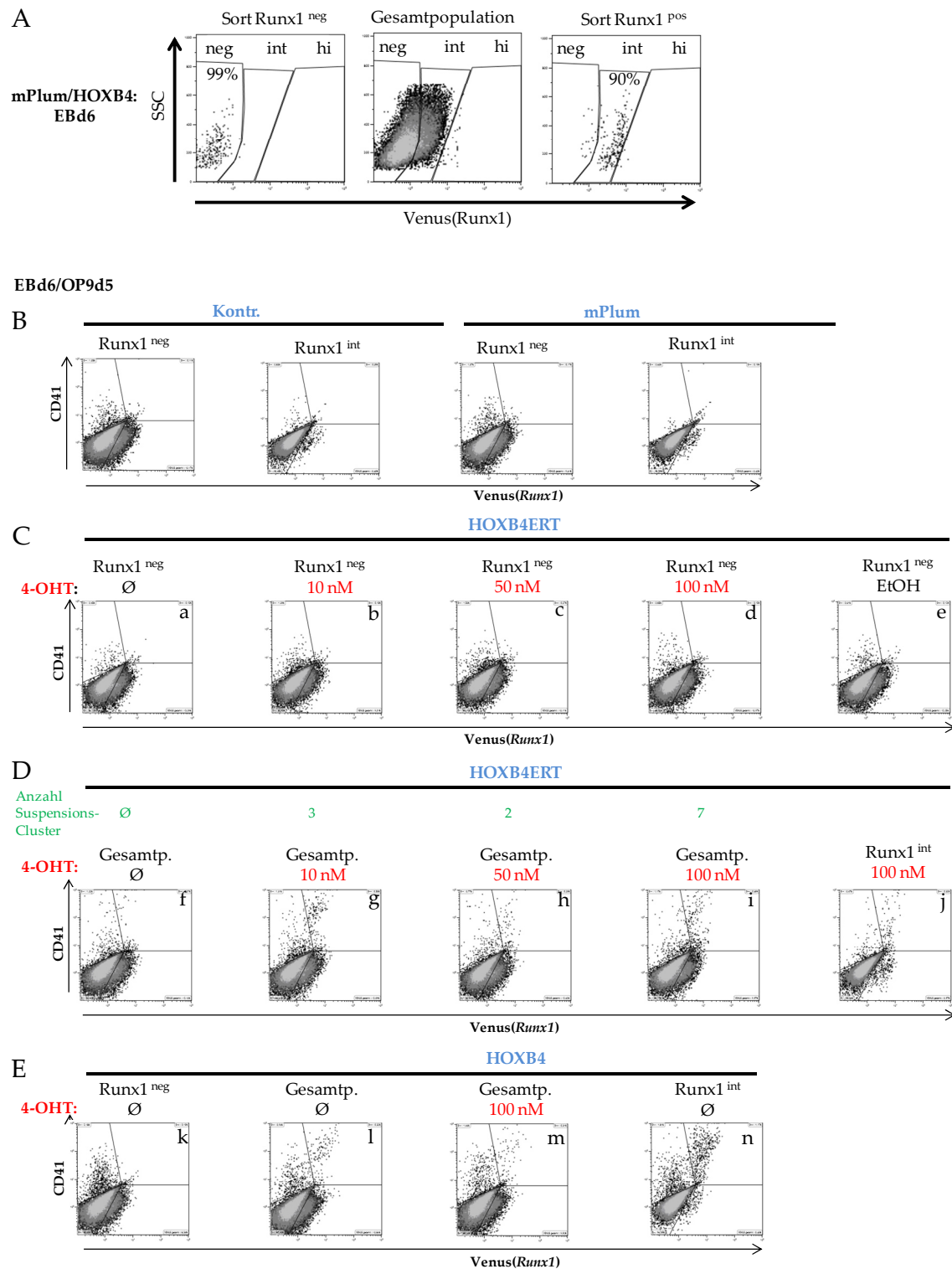


Abb. 27: Durchflusszytometrische Analyse des hämatopoetischen Potenzials *Runx1*^{neg} - und *Runx1*^{pos} sortierter Subpopulationen

(A) Nach Zellsortierung dissoziierter *Runx1*^{Venus/+} Tag 6 EBs in die Subpopulationen (*Runx1*^{neg}, *Runx1*^{int}) der Proben (Kontr., mPlum (B), mPlum/HOXB4ERT +/- 4-OHT (C+D), mPlum/HOXB4 (E)) wurden diese für fünf Tage auf OP9-Zellen differenziert. Am Tag 5 wurden die Zellen geerntet und mit CD41-PE-konjugierten AK gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Qualität CD41^{hi}*Runx1*^{hi} Zellen hervorbringen zu können beurteilt. 4-OHT wurde in der Gesamtpopulation mPlum/HOXB4ERT (D (g-i)) und *Runx1*^{int} Subpopulation (D (j)) titriert [10 nM, 50 nM, 100 nM]. Die

EtOH Lösungsmittelkontrolle, vergleichbar mit der höchsten eingesetzten 4-OHT Konzentration, wurde in mPlum/HOXB4ERT Zellen (*Runx1*^{neg}) getestet (C (e)). In der konstitutiv HOXB4 exprimierenden Gesamtpopulation wurde ein toxischer Einfluss von [100 nM] 4-OHT auf die Entstehung CD41^{hi}Venus^{hi} Zellen ausgeschlossen (E (m)). Außerdem wurde nach 5 Tagen Differenzierung auf OP9-Zellen (OP9d5) die Anzahl an Suspensionsclustern gezählt (in grün: D). Abk.: Gesamtp. = Gesamtpopulation

3.4. HOXB4 verstärkt die Entstehung des hämogenen Endothels und beeinflusst die Proliferation von CD41⁺CD45⁺ Zellen synergistisch mit Runx1

In *Runx1*^(-/-) ESZ, in denen *Runx1* ektopt mittels Doxyzyklin (Dox) induziert werden kann (*iRunx1*^(-/-)), sollte die synergistische Aktivität von HOXB4 und Runx1 detaillierter untersucht werden.

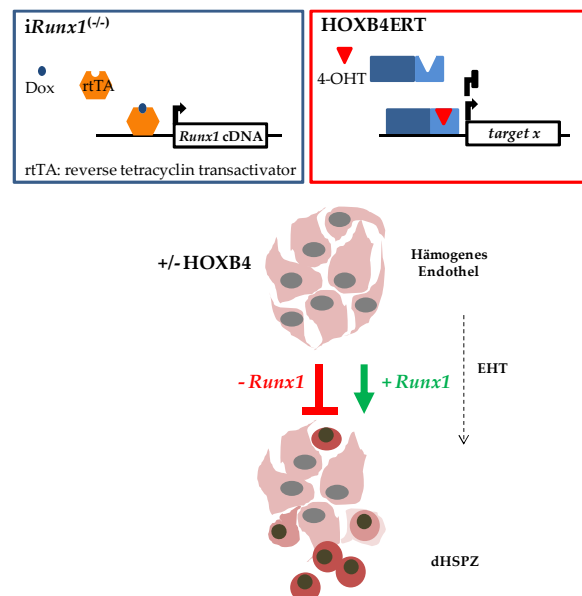


Abb. 28: Regulierbarkeit der *iRunx1*-ESZ während der hämatopoetischen Differenzierung

Die *iRunx1* ESZ-Linie basiert auf einem homozygoten *Runx1* knock-out (*Runx1*^(-/-)). Die Zellen können unter der Kontrolle von Doxyzyklin (Dox) über die Präsenz eines reversen Tetrazyklin transkriptionellen Transaktivators (rtTA) *Runx1* exprimieren und damit den Übergang vom HE zu dHSPZ (EHT) veranlassen. Mit Hilfe der HOXB4ERT Fusion kann die HOXB4 Kernlokalisierung zusätzlich über 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) reguliert werden. Abk.: EHT: *endothelial-to-hematopoietic transition*; dHSPZ: definitive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen.

Der Vorteil dieser ESZ ist, dass sie eine spezifische Regulation der *Runx1* Expression ermöglichen. Ohne die Zugabe von Dox wird in den Zellen kein *Runx1* exprimiert. Da der Transkriptionsfaktor Runx1 und dessen Zielgene *Gfi1* und *Gfi1b* den Prozess

der EHT einleiten [Lancrin et al. 2012], bleiben die *iRunx1*-ESZ ohne Dox Zugabe im Stadium des HEs stehen und durchlaufen keine EHT (Abb. 28). Werden die ESZ zusätzlich mit FMEV-HOXB4ERT transduziert, kann auch die Kernlokalisation der HOXB4ERT Fusion durch 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induziert werden. Dadurch ergibt sich ein kontrollierbares Schaltsystem mit dem das Zusammenwirken von HOXB4 und Runx1 genauer analysiert werden kann.

3.4.1. In *iRunx1*-Zellen wird durch Zugabe von Doxyzyklin das hämatopoetische Programm initiiert

Vor Beginn der Experimente musste zunächst geklärt werden, ob in dem FBS der Firma PAA, das standardmäßig in dieser Arbeit für die ESZ-Kultivierung und Differenzierung genutzt wurde, mögliche Tetrazyklin Rückstände enthalten sind. Dies würde zu einer ungewollten Induktion der *Runx1* Expression führen. Das FBS der Firma PAA wurde im direkten Vergleich mit Tetrazyklin negativen Serum der Firma GE Healthcare (#A11-109, Lot: 1/A10912-2537 / DE1303358) in *iRunx1*-ESZ getestet (Abb. 29A).

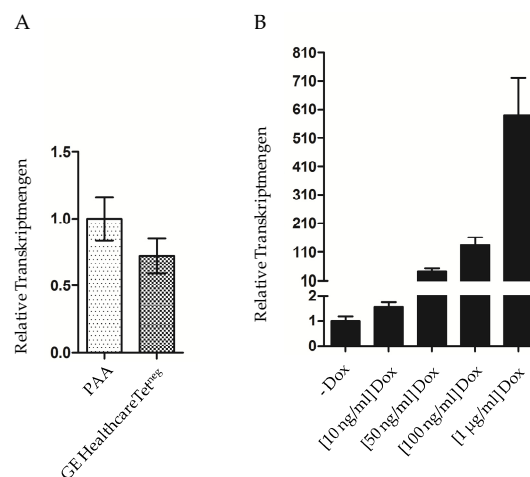


Abb. 29: Serumtest und Titration von Doxyzyklin

(A) FBS der Firma PAA wurde mit dem Tet^{neg} Serum der Firma GE Healthcare auf Tetrazyklin Rückstände überprüft. Gemessen wurde die relative Expression von *Runx1* im nicht induzierten Zustand in *iRunx1*-ESZ (Kontr.) mittels qRT-PCR Analyse. (B) Titration unterschiedlicher Dox Konzentrationen ([10 ng/ml], [50 ng/ml], [100 ng/ml], [1 µg/ml]) in *iRunx1*-ESZ. Dargestellt ist der Mittelwert $n=3$, \pm SD. Die Werte sind gegen die Referenzgene *Gapdh* und *Actb* normalisiert und in Bezug zur -Dox Probe gesetzt.

Es war tendenziell kein Unterschied der *Runx1* Expression bei Verwendung der beiden Seren messbar. Für die folgenden Experimente wurde daher das FBS der Firma PAA benutzt. Im Vorversuch wurde das Ausmaß der *Runx1* Induzierbarkeit mit vier verschiedenen Dox Konzentrationen ([10 ng/ml], [50 ng/ml], [100 ng/ml], [1 µg/ml]) in *iRunx*-ESZ (Kontr.) titriert und die *Runx1* Expression über qRT-PCR Analysen detektiert (Abb. 29B). Die Induzierbarkeit von *Runx1* stieg mit zunehmender Dox Konzentration an. Die zwei höchsten Dox Konzentrationen [100ng/ml] und [1µg/ml] wurden für das anschließende Experiment eingesetzt. Die erste Differenzierung mit dieser ESZ-Linie wurde zunächst nur mit nicht-transduzierten *iRunx1*-ESZ (Kontr.) und den beiden Dox Konzentrationen [100 ng/ml] und [1 µg/ml] durchgeführt (Abb. 30).

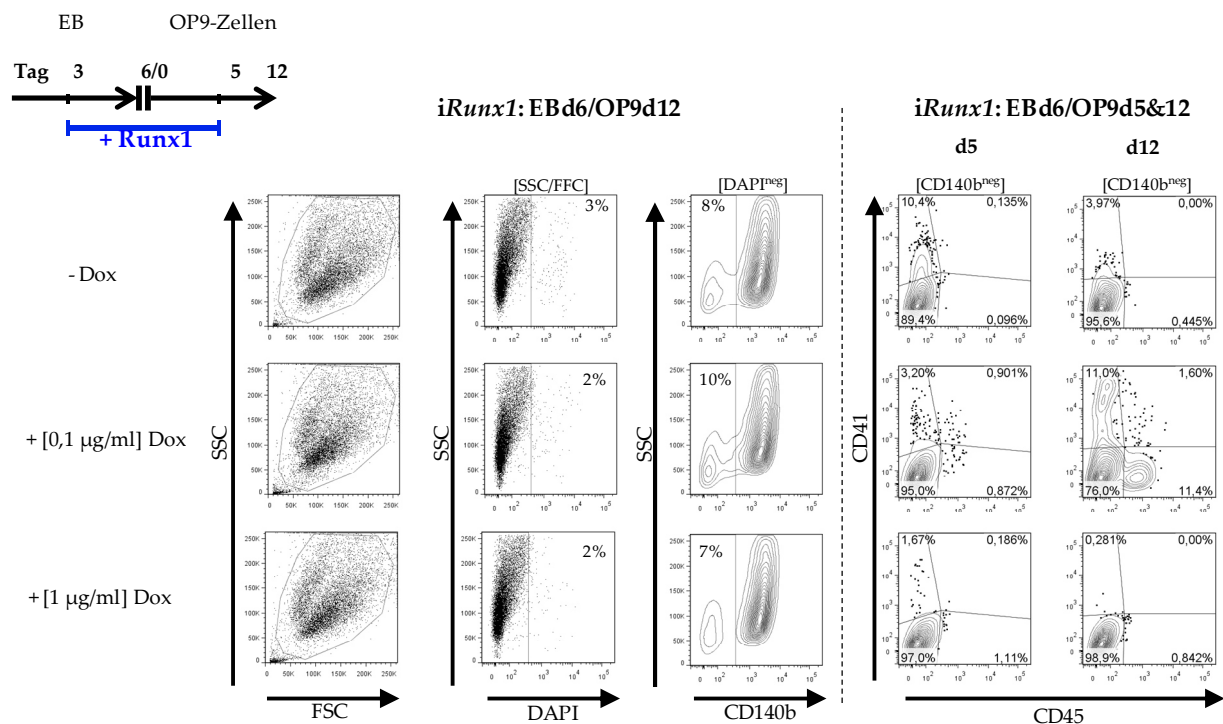


Abb. 30: Überprüfung der Doxzyklin-abhängigen Induzierbarkeit von *Runx1*

Analysiert wurde die Expression von CD41-FITC und CD45-APC in *iRunx1* Kontrollzellen nach fünf und zwölf Tagen Kultivierung auf OP9-Zellen mittels Durchflusszytometrie. DAPI⁺ und CD140b⁺ (OP9, Biotin SA-PerCP-Cy5.5 markiert) Zellen wurden aus der Messung ausgeschlossen; hier für Tag 12 auf OP9-Zellen exemplarisch dargestellt. Dox wurde in den Konzentrationen [0,1 µg/ml] und [1 µg/ml] von EB Tag 3 bis Tag 5 Kokultur ins Medium gegeben.

Mithilfe der zuvor durchgeführten Bestimmung der Expressionskinetik von *Runx1* in den *Runx1*^{Venus/+} Reporter-ESZ (Abb. 23) konnte der Beginn der endogenen *Runx1* Expression bestimmt und auf das folgende Experiment übertragen werden. Daraufhin wurde mit der Induktion von *Runx1* ab Tag 3 der EB-Differenzierung begonnen und bis Tag 5 auf OP9-Zellen fortgeführt. Am Tag 5 und 12 der Kokultivierung wurden die Zellen geerntet und die Expression von CD41 und CD45 durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Messungen zu > 90% vital. Die OP9-Zellen wurden über den AK CD140b markiert und von der Analyse ausgeschlossen. Nach Zugabe von [0,1 µg/ml] Dox entstanden innerhalb von 12 Tagen Kokultur 11% CD41⁺ und 11% CD45⁺ Zellen (Abb. 30). Damit konnte die Induzierbarkeit von *Runx1* und dessen essentielle Wirkung auf die Entstehung von hämatopoetischen Zellen in diesem System gezeigt werden. Ohne Dox Zugabe konnten nur transient 10% CD41^{lo} exprimierende Zellen detektiert werden, die am Tag 12 kaum noch nachweisbar waren. Obwohl mit [1 µg/ml] Dox ein fast 600-facher Expressionsanstieg im Vergleich zur -Dox Probe mittels qRT-PCR Analyse gemessen wurde (Abb. 29B) konnte keine Umwandlung in hämatopoetische Zellen erzielt werden (Abb. 30). Da es sich offensichtlich um einen Dosiseffekt handelt, wurde für alle weiteren *Runx1* Induktionsexperimente eine Konzentration von [0,1 µg/ml] Dox eingesetzt.

3.4.2. HOXB4 vermittelt eine Expansion des hämogenen Endothels

Nachdem die Funktionalität der *iRunx1*-ESZ im Vorfeld getestet wurde, wurden die Zellen mit retroviralen Vektoren zur konstitutiven und induzierbaren HOXB4 Expression transduziert (Abb. 31). Letztere ermöglichte eine flexible Regulierbarkeit von HOXB4 und *Runx1* während der Differenzierung. Zunächst wurde *Runx1* nicht induziert, sodass sich die Zellen nur bis zum HE entwickeln konnten. Dadurch konnten die HE-ähnlichen Kolonien besser charakterisiert werden. Der bereits mit den CCE-ESZ beobachtete Einfluss von HOXB4 auf die Anzahl der Endothelkolonien (Abb. 19, Abschnitt: 3.1.4) wurde mit den *iRunx1*-Zellen noch deutlicher sichtbar (Abb. 32).

ESZ *iRunx1*^(-/-) → Transduktion → Kultivierung → Entfernung CF1-MEF

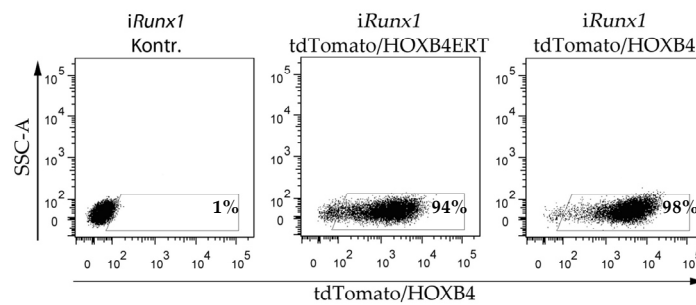


Abb. 31: FMEV transduzierte *iRunx1*-ESZ für die EB-Differenzierung

Die auf CF1-MEF kultivierten *iRunx1*-ESZ wurden zunächst mit FMEV-tdTomato/HOXB4 und tdTomato/HOXB4ERT transduziert und nach Entfernung der CF1-MEF mittels MACS im Durchflusszytometer gemessen. *iRunx1*-Zellen ohne Transduktion (Kontr.) wurden als Kontrolle mitgeführt.

Die Anzahl an Endothelkolonien war gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht, wenn HOXB4 aktiviert wurde (tdTomato/HOXB4ERT + [100 nM] 4-OHT ab d0) nämlich 30-fach (Abb. 32).

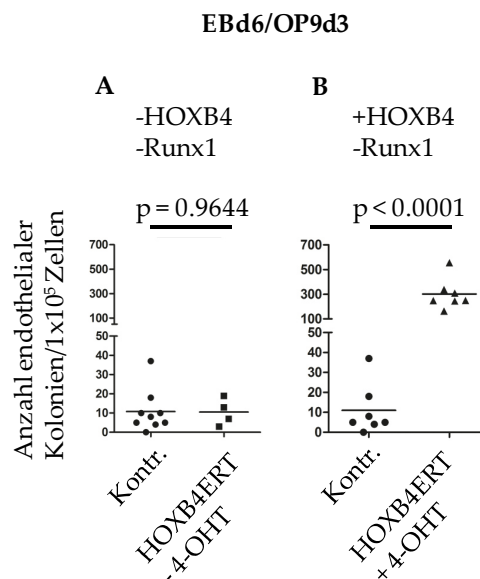


Abb. 32: Anzahl von *bona fide* HE-Kolonien +/- HOXB4 Modulation

Anzahl HE-ähnlicher Kolonien pro 1x10⁵ ausplattierten dissoziierten Tag 6 EB-Zellen pro 6 Well +/- HOXB4 Induktion am Tag 3 auf OP9-Zellen. (A) Nicht transduzierte Zellen (Kontr.) wurden neben den nicht-aktivierten HOXB4ERT Zellen (- 4-OHT) als Kontrollen mitgeführt. (B) Mit der HOXB4 Aktivierung ([100 nM] 4-OHT) wurde bereits ab dem ersten Tag der Differenzierung begonnen (d0). *Runx1* wurde über den gesamten Zeitraum nicht induziert (A, B). Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert als horizontale Linie. Statistische Signifikanz wurde über den *Student's t-test* berechnet.

3.4.2.1. Eine ektope Expression von HOXB4 führt zur Vermehrung von Zellen, die immunphänotypisch dem HE entsprechen

Im folgenden Abschnitt wurden die Endothelkolonien anhand der Koexpression HE-assoziiierter Oberflächenmarker charakterisiert, um weitere Hinweise für die Existenz eines HEs zu erhalten. Die Expression von *Runx1* wurde nicht induziert. Dadurch verblieben die Zellen im HE-Stadium und konnten besser charakterisiert werden. Untersucht wurde die Expression der Oberflächenmarker von Tie2, Flk1 und VE-cad mittels Durchflusszytometrie (Abb. 33B). Von 1×10^5 ausplattierten Zellen haben 0,428% (428 Kolonien) der Zellen in HOXB4 Kulturen, 0,249% (249 Kolonien) der 4-OHT induzierten HOXB4ERT Zellpopulation und 0,018% (18 Kolonien) der Kontrollzellen, Endothelkolonien gebildet (Abb. 33A).

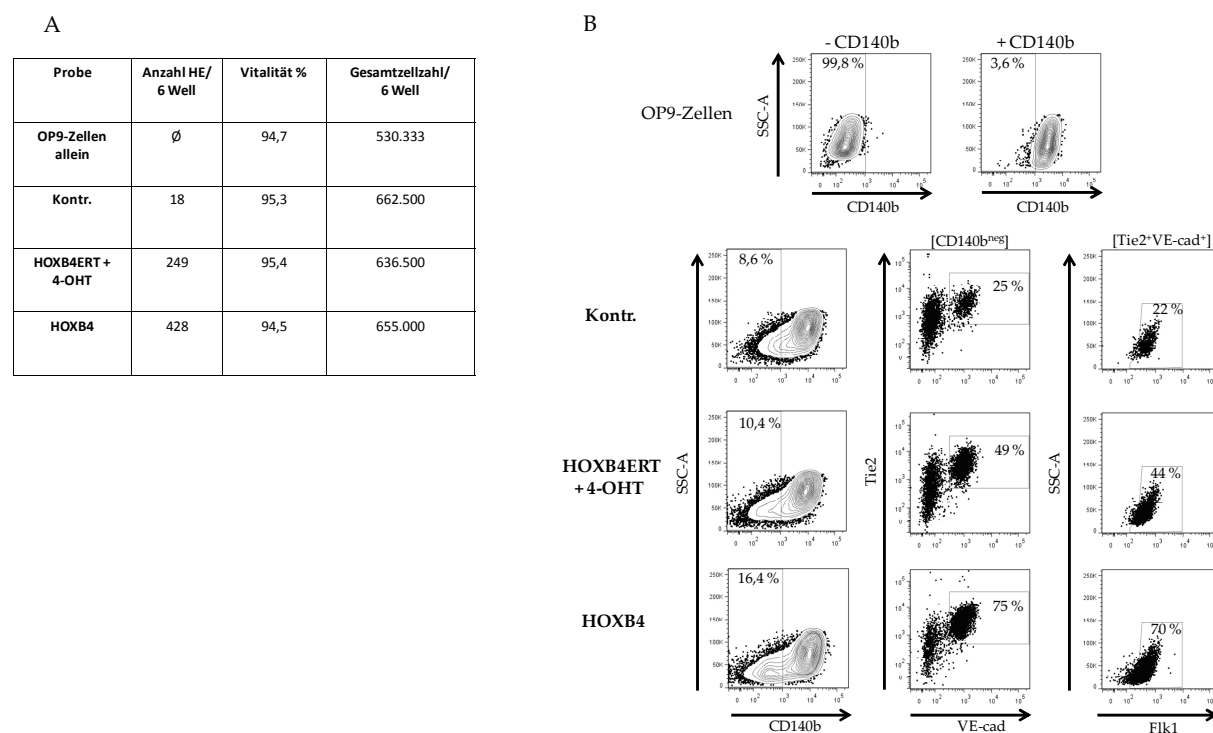


Abb. 33: Koexpression HE-assoziiierter Oberflächenmarker

1×10^5 *iRunx1* Tag 6 EBs (nicht-transduziert (Kontr.), HOXB4ERT (+ [100 nM] 4-OHT ab Tag 0 EB-Differenzierung), HOXB4 konstitutiv) wurden dissoziiert und auf OP9-Zellen für drei Tage differenziert. (A) Tabellarische Zusammenfassung: Ermittelt wurde die Anzahl der Kolonien am Tag 3 während der Kokultivierung mit OP9-Zellen. Vitalität (%) und Zellzahl wurden mittels Casy vor der durchflusszytometrischen Messung bestimmt. (B) Die Kombination der Oberflächenantigene VE-cad, Tie2, Flk1 wurde mittels Fluoreszenz-gekoppelter AK detektiert (VE-cad-BV421, Flk1-FITC, Tie2-APC). Die OP9-Zellen wurden anhand der Expression von CD140b aus der Analyse ausgeschlossen. Die angegebenen Prozente beziehen sich auf die Hauptpopulation ohne OP9-Zellen.

In allen OP9-ESZ Kulturen (Kontr., HOXB4ERT (+ 4-OHT), HOXB4 konstitutiv) war die Gesamtzellzahl ähnlich (Abb. 33A). Mit HOXB4ERT transduzierten und durch 4-OHT aktivierten Zellen entstanden im Vergleich zur konstitutiven HOXB4 Variante weniger Kolonien (Abb. 33A), dass auch mit dem prozentualen Anteil Tie2⁺VE-cad⁺Flk1⁺ Zellen korrelierte (Abb. 33B) und auf einen bereits publizierten Dosisseffekt von HOXB4 hinweist [Pilat *et al.* 2005]. Im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (Kontr.) sind aber eindeutig mehr Kolonien entstanden. Anhand des in Abb. 33B dargestellten Ergebnis wird ersichtlich, dass alle Zellen die Tie2⁺VE-cad⁺ waren auch Flk1 exprimierten. 25% der Kontrollzellen (Kontr.) und 75% HOXB4 bzw. 49% HOXB4ERT (+ 4-OHT) transduzierte Zellen waren VE-cad⁺Flk1⁺Tie2⁺. Darüber hinaus war die Gesamttranskriptmenge von wichtigen hämatopoetischen Schlüsselregulatoren in HOXB4 Kulturen erhöht (Abb. 34).

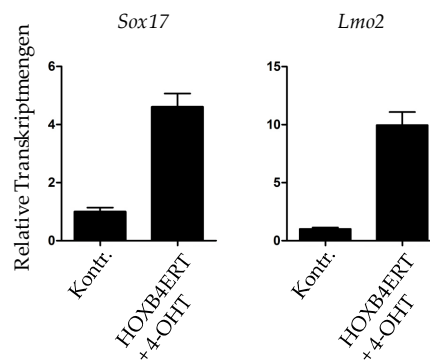


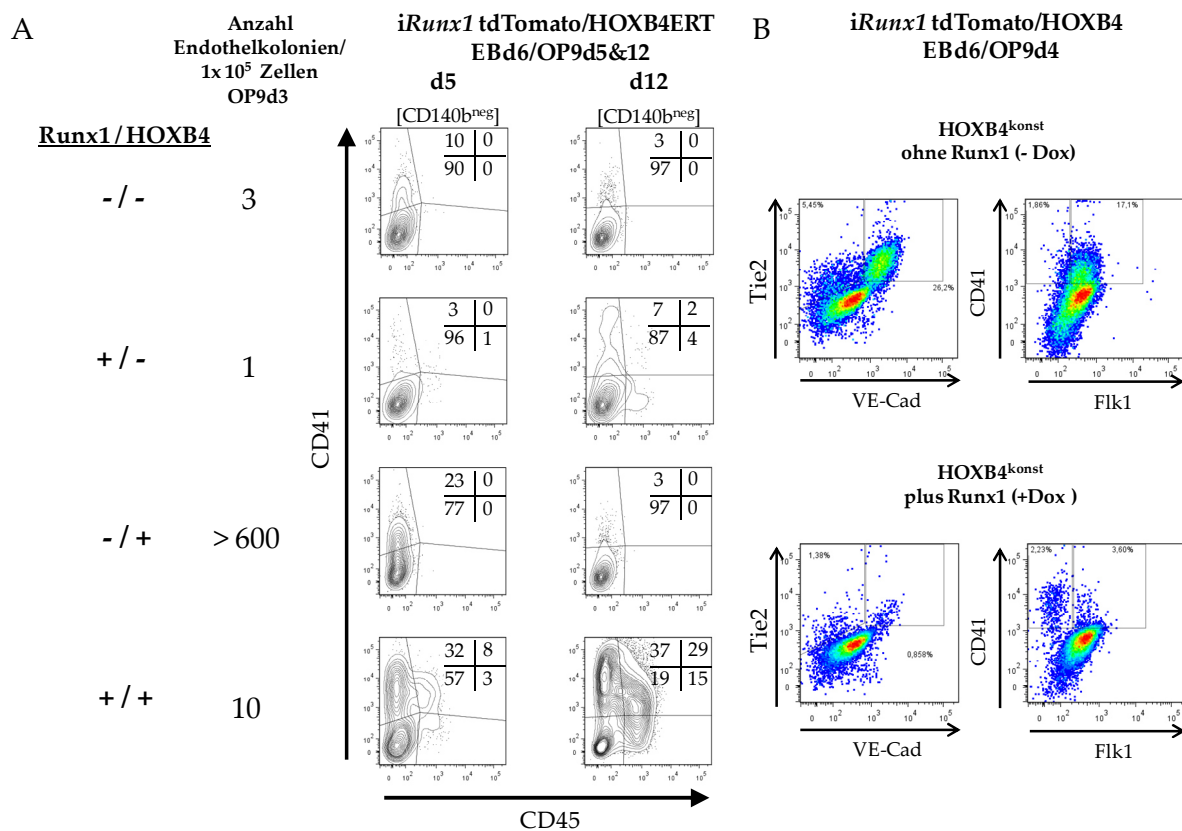
Abb. 34: Relative Transkriptmengen von Sox17 und Lmo2 in iRunx1-Zellen

In qRT-PCR Analysen wurden die relativen Transkriptmengen von *Sox17* und *Lmo2* in nicht-transduzierten (Kontr.) und in tdTomato/HOXB4ERT transduzierten iRunx1-Zellen ermittelt. *Runx1* wurde nicht induziert. HOXB4 wurde über die gesamte Zeit der Differenzierung mit [100 nM] 4-OHT aktiviert. Die Tag 6 EBs wurden dissoziiert und 1×10^5 Zellen auf OP9-Zellen für drei Tage kultiviert. Am Tag 3 wurden die Zellen vereinzelt und mit CD140b-PE konjugiertem AK gefärbt, um über Anti-PE *Beads* (Miltenyi) mittels MACS die OP9-Zellen zu depletieren. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (n=3) \pm SD. Die Werte wurden gegen die Expression von *Gapdh* und *Actb* normalisiert und in Relation zur Kontrolle (- HOXB4 / - Runx1) gesetzt.

In qRT-PCR Analysen konnten höhere Transkriptmengen des TFs *Sox17* (5-fach) und *Lmo2* (10-fach) nachgewiesen werden, wenn HOXB4 über 4-OHT Zugabe aktiviert wurde (HOXB4ERT + 4-OHT ab d0 EB-Differenzierung) im Vergleich zu den Kontrollzellen (-HOXB4 / -Runx1), dass wahrscheinlich auf die Expansion der Endothelkolonien zurückzuführen ist.

3.4.2.2. Synergistische Aktivität von HOXB4 und Runx1 während der Endothel-zu-Hämatopoese Transition

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob HOXB4 und Runx1 während des Übergangs von HE-Zellen zu HSPZ in irgendeiner Form zusammenwirken. Das Ausmaß des synergistischen Effekts von Runx1 und HOXB4 auf die Entstehung CD41⁺ und CD45⁺ hämatopoetischer Zellen wird in Abb. 35 deutlich. Aus aktivierten HOXB4ERT Zellen (+ 4-OHT ab d0EB-Differenzierung), ohne *Runx1* Aktivität, bildeten sich > 600 Endothelkolonien pro 1x10⁵ ausplattierte d6EB-Zellen (min. 0,6%) gegenüber der Transduktionskontrolle (HOXB4ERT-4-OHT) mit drei Kolonien (0,003%) (Abb. 35A). In beiden Fällen entstand nur temporär eine CD41^{lo} Subpopulation, weil *Runx1* nicht induziert wurde. Ohne *Runx1* Induktion haben die Zellen nicht das endotheliale Programm abgestellt und exprimierten weiterhin die Oberflächenmarker für Tie2, VE-Cad, Flk1 (Abb. 35B).



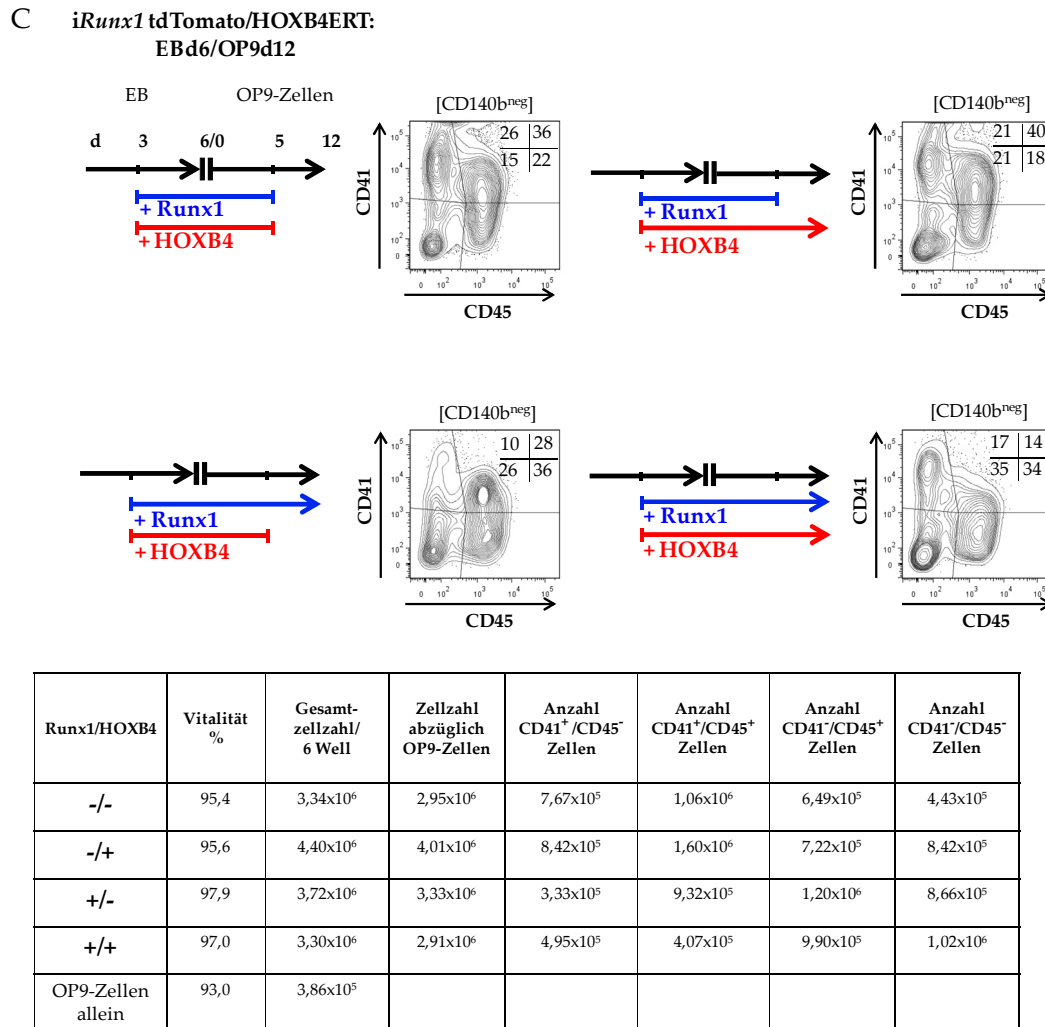


Abb. 35: Synergistische Aktivität von HOXB4 und Runx1 bei der Entstehung von hämatopoetischen Zellen

In drei verschiedenen Experimenten (A, B, C) wurde die Entstehung von CD41⁺ und CD45⁺ Zellen +/- *Runx1* Induktion [0,1 µg/ml] (ab Tag 3 EB-Formation) in Kombination +/- HOXB4 Aktivität nach OP9-Ausschluss über CD140b (A, C) durchflusszytometrisch gemessen. (A) In tdTomato/HOXB4ERT transduzierten *iRunx1* Zellen wurden am Tag 3 auf OP9-Zellen die Endothelkolonien gezählt und am Tag 5 und 12 die Expression von CD41 (APC-markiert) und CD45 (FITC-markiert) +/- Dox bzw. [100 nM] 4-OHT Zugabe (ab Tag 3 EB-Formation) gemessen. (B) Dargestellt ist die Expression der Oberflächenmarker Tie2 (APC), VE-cad (Biotin-SA-PerCP-Cy5.5), CD41 (APC eFluor) und Flk1 (FITC) am Tag 4 der Kokultivierung in konstitutiv HOXB4 exprimierenden *iRunx1*-Zellen +/- Dox Zugabe. (C) Der Einfluss einer zeitlich regulierten *Runx1* oder HOXB4 Induktion auf die Expression von CD41 (APC) und CD45 (FITC) ist gezeigt. *Runx1* und HOXB4 wurden in HOXBERT transduzierten Zellen ab Tag 3 EB-Formation bis Tag 5 auf OP9-Zellen induziert. Ab Tag 5 wurde *Runx1* und HOXB4 zusammen oder einzeln weiter induziert bzw. aktiviert. Die Prozentwerte nach OP9 Ausschluss sind rechts oben im jeweiligen Kontourplot angegeben. Die Gesamtzellzahl (CD41⁺, CD41⁺/CD45⁺, CD45⁺, CD41⁻/CD45⁻) abzüglich OP9-Zellen ist tabellarisch unterhalb der Grafik dokumentiert.

Mit der Induktion von *Runx1* wurde das hämatopoetische Programm initiiert. Als Folge entstand eine CD41⁺Flk⁻ Zellpopulation (Flk1 Expression wird durch *Runx1*

direkt reprimiert [Hirai *et al.* 2005]) (Abb. 35B) und CD41^{hi} (7%), CD45⁺ (4%) hämatopoetische Zellen (HOXB4/+Runx1) (Abb. 35A). Nach Induktion beider Transkriptionsfaktoren wurde eine starke Zunahme der CD41⁺CD45⁻, CD41⁺CD45⁺, CD41⁻CD45⁺ Zellpopulationen beobachtet. Die Zellen entwickelten sich zu CD41⁻CD45⁺ Zellen weiter wenn *Runx1* über einen längeren Zeitraum als HOXB4 induziert wurde (Abb. 35C + Tabelle). Die absolute Anzahl von CD41⁺ Zellen nahm ab und die Gesamtzellzahl von CD45⁺ Zellen nahm zu.

3.4.2.3. Die Endothelzellen in der Kolonie sind hämogen

Ob es sich bei den Endothelkolonien tatsächlich um ein hämogenes Endothel handelt, sollte mittels Zeitrafferaufnahmen geklärt werden (Abb. 36).

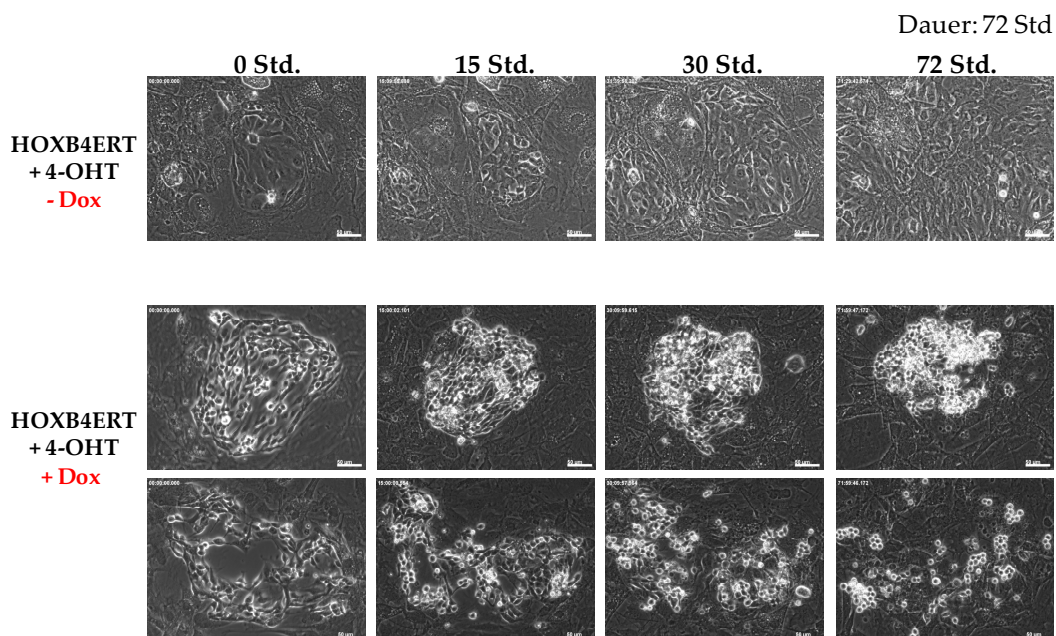


Abb. 36: Zeitrafferaufnahmen von der Umwandlung des hämogenen Endothels in HSPZ

Die Umwandlung von *iRunx1* tdTomato/HOXB4ERT-abgeleiteten HE-Kolonien in HSPZ wurde in einer 72-stündigen Zeitrafferaufnahme bei einer 200x Vergrößerung +/-Dox Behandlung festgehalten. Ausgewählte Zeitpunkte der Phasenkontrastaufnahmen (0 Std., 15 Std., 30 Std., 72 Std.) sind hier abgebildet. HOXB4ERT wurde mit Beginn der EB-Differenzierung (d0) induziert [100 nM] 4-OHT. Tag 6 EBs wurden dissoziiert, auf OP9-Zellen kultiviert und [0,1 µg/ml] Dox am Tag 2 und 4 ins Medium gegeben. Die Transition wurde unter kontinuierlichen hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 5% CO₂, 37°C) alle 10 min ab Tag 4 auf OP9-Zellen dokumentiert. Für die Bedingung + *Runx1* (+Dox) Induktion sind 2 Endothel-zu-Hämatopoese Transitionen gezeigt.

Mit Hilfe dieser Analysetechnik kann das Zellschicksal jeder einzelnen Zelle innerhalb der Kolonie verfolgt werden. 72 Stunden lang wurde alle 10 min eine

Phasenkontrastaufnahme in 200x-facher Vergrößerung durchgeführt. Die HOXB4 iRunx1-Zellen wurden direkt am Mikroskop (*Chamber*) (3% O₂, 5% CO₂, 37°C) kultiviert. HOXB4ERT wurde während der gesamten Differenzierung mit 4-OHT induziert. Da die vollständige Induktion der *Runx1* Expression etwa 24 Std. nach Dox Zugabe benötigt, wurde *Runx1* bereits vor Beginn der Zeitrafferaufnahmen induziert. Deshalb wurde am Tag 2 und 4 während der Kokultivierung [0,1 µg/ml] Dox zugegeben und die Aufnahmen ab Tag 4 gestartet. Nicht-induzierte Zellen (-Runx1) dienen als Kontrolle. Während Kolonien ohne *Runx1* Induktion im Verlauf der Messung immer größer wurden und keine Suspensionszellen entstanden, zogen sich die Zellen + *Runx1* Induktion zunächst zusammen, rundeten sich ab und gingen in Suspension, als sie die Endothel-zu-Hämatopoese Transition (EHT) durchliefen. Durch Zugabe eines APC-konjugierten CD41 Antikörpers ins Medium konnte gezeigt werden, dass die Zellen im Zuge der Transition, den frühest bekannten hämatopoetischen Marker CD41 exprimierten (Abb. 37A). Die weißen Pfeilspitzen markieren Zellen, die vor der Transition noch adhären waren und bereits CD41 exprimierten. Ein Hinweis dafür, dass die Zellen schon früh instruiert werden, um das hämatopoetische Programm von adhären zu nicht-adhären Zellen durchlaufen zu können. Die Expressionshöhe von HOXB4 scheint auch einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von HSPZ zu haben. Eine höhere HOXB4 Expression korrelierte mit einer höheren Venus(*Runx1*) Expression und einem höheren Anteil CD41⁺ Zellen (Abb. 37B). Wegen der erhöhten *Runx1* Expression konnten die HOXB4⁺ hämatopoetischen Zellen, infolge einer starken Venusfluoreszenz, mikroskopisch detektiert und von den adhären Zellen unterschieden werden (Abb. 37C). Damit der Mechanismus der HOXB4 Aktivität in einer definierten Zellpopulation („Zielzelle von HOXB4“) analysiert werden kann, muss diese identifiziert und anschließend angereichert werden. Dass setzt voraus, dass man einzelne Entwicklungsstufen während der Entstehung HSPZ definieren und einteilen kann. Expressionsanalysen HE-spezifischer und HSPZ-spezifischer

Gene können beim Übergang von Endothelzellen zu HSPZ entscheidende Informationen über den Entwicklungsstatus einer Zelle liefern.

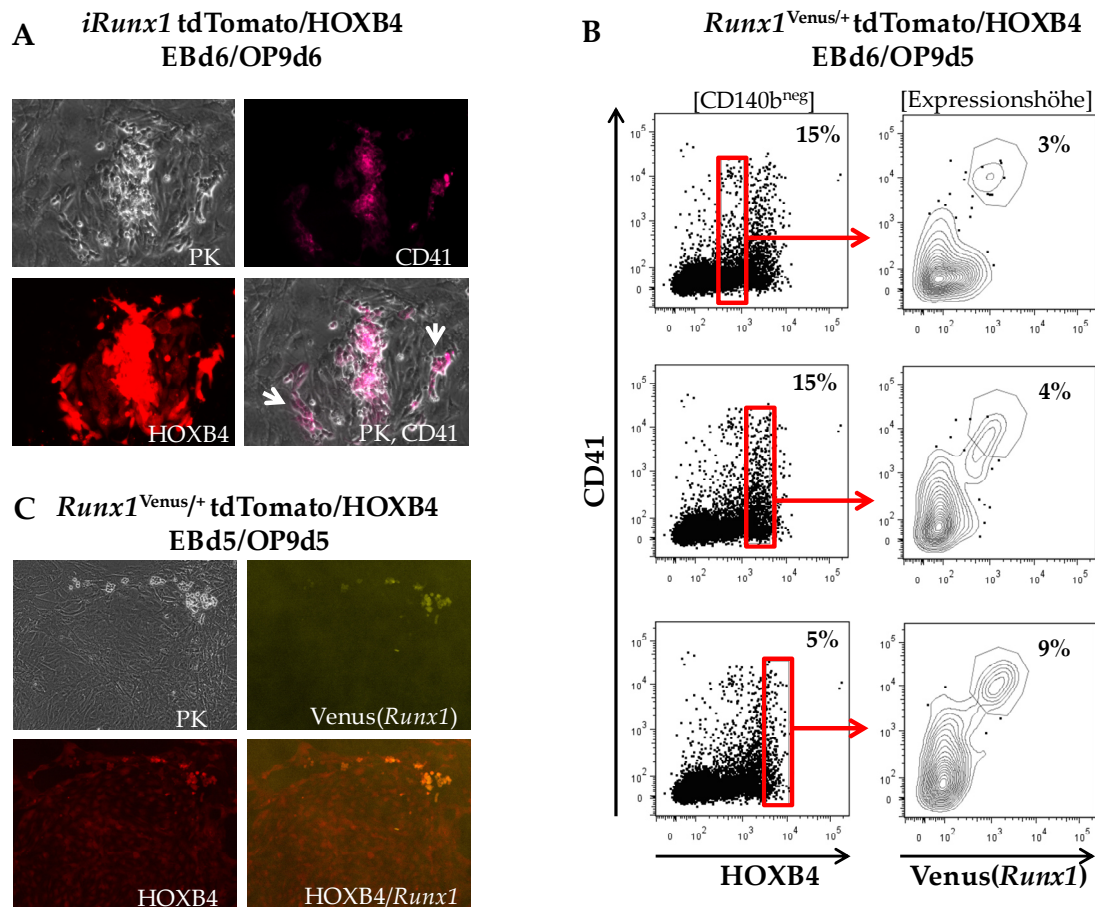


Abb. 37: Charakterisierung der Expressionshöhe von HOXB4 und der Entstehung HOXB4⁺CD41⁺ bzw. HOXB4⁺Runx1⁺ Zellen

iRunx⁻ (A) und *Runx1*^{Venus/+} (B, C) ESZ wurden für sechs Tage als EBs unter normoxischen (A) und hypoxischen Bedingungen (B, C) differenziert und anschließend auf OP9-Zellen kultiviert (3% O₂, 5% CO₂, 37°C). In (A) ist eine Aufnahme (200x Vergrößerung) von der Transition des HEs in CD41⁺ Zellen gezeigt, die im Verlauf einer 72-stündigen Zeitrafferaufnahme mit konstitutiv HOXB4 exprimierenden *iRunx1*-Zellen entstanden ist (Tag 6 der Kokultivierung). Mit der Induktion wurde 48 Std. vor dem Start der Aufnahmen begonnen ([0,1 µg/ml] Dox). Alle 15 min wurde eine PK- und Fluoreszenzaufnahme gemacht. Mit der Zugabe des CD41 APC-konjugierten AKs [200 ng/ml] wurde kurz vor Aufnahmestart begonnen. (B) Von FMEV-tdTomato/HOXB4 transduzierten *Runx1*^{Venus/+} Zellen wurde am Tag 5 auf OP9-Zellen die Expressionshöhe von HOXB4 mit der Expressionshöhe von *Runx1*⁺CD41⁺ Zellen korreliert. (C) HOXB4⁺*Runx1*⁺ Suspensionscluster am Rand einer HE-Kolonie aus tdTomato/HOXB4 transduzierten *Runx1*^{Venus/+} (OP9d5). Die Suspensionszellen sind stark Venusfluoreszenz positiv. 100x Vergrößerung von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen. Abk.: PK; Phasenkontrast

In HE-arretierten Zellen (ohne *Runx1* Induktion) wurden größere Transkriptmengen von *Lmo2* und *Sox17* in HOXB4 transduzierten Zellen gemessen (Abb. 34). Wurde *Runx1* angeschaltet konnten sich die Zellen weiter entwickeln und exprimierten die

Runx1 Zielgene *Gfi1*, *Gfi1b* und *Pu.1* (Abb. 38). Eine 24-stündige *Runx1* Induktion führte zu einer Hochregulation der Expression von *Gfi1*. Das Protein Gfi1 ist entscheidend für die Morphologieveränderungen der Zellen zu Beginn der EHT und reguliert mit *Gfi1b* die Transition von den HE-Zellen zu den HSPZ [Lancrin *et al.* 2012]. Die Zellen verlieren ihren Endothelcharakter, runden sich ab und leiten das hämatopoetische Programm ein. Dadurch kommt es zur Hochregulation weiterer hämatopoetischer Schlüsselregulatoren. Dies konnte nach längerer *Runx1* Induktion durch die Bestimmung der relativen Gesamttranskriptmengen von *Gfi1b* und *Pu.1* gezeigt werden (Abb. 38). Ähnlich dem Ergebnis der Expressionsanalyse von *Lmo2* und *Sox17* konnten in der Gesamtpopulation HOXB4 transduzierter Zellen größere Mengen der Transkripte von *Pu.1* und *Gfi1* gemessen werden, dass mit der HOXB4-vermittelten Expansion HSPZ korrelierte.

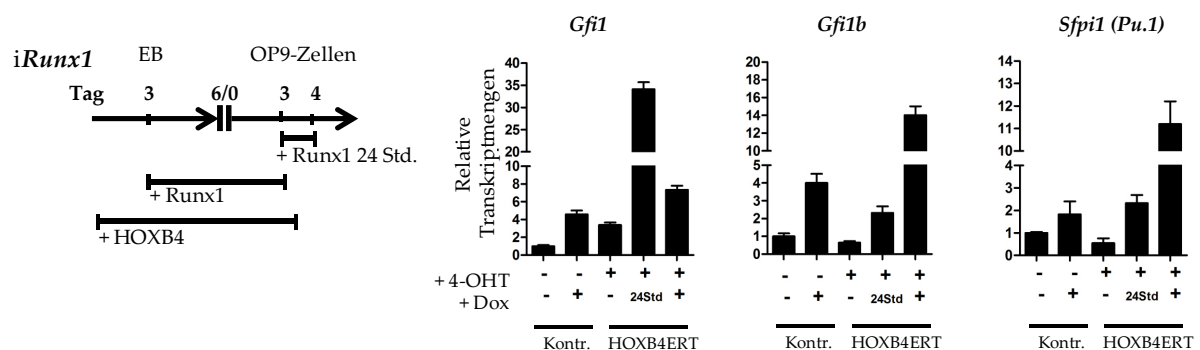


Abb. 38: Expressionsanalyse der Runx1 Zielgene: *Gfi1*, *Gfi1b*, *Sfp1*

Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von *Gfi1*, *Gfi1b* und *Sfp1* in nicht-transduzierten (Kontr.) und mit tdTomato/HOXB4ERT transduzierten iRunx1-Zellen mittels qRT-PCR Analyse. Tag 6 EBs wurden dissoziiert und 1×10^5 Zellen auf OP9-Zellen für weitere drei Tage kultiviert. Am Tag 3 wurden die Zellen vereinzelt und mit einem Anti-CD140b-PE-konjugierten AK markiert, um mit Anti-PE Beads (Miltenyi) mittels MACS die OP9-Zellen zu depletieren. [100nM] 4-OHT wurde in HOXB4ERT transduzierten Zellen über die gesamte Differenzierungszeit ins Medium gegeben. *Runx1* wurde entweder ab d3EB-Differenzierung induziert ([0,1 µg/ml] Dox) oder, um die Endothel-zu-Hämatopoese Transition besser analysieren zu können, für 24 Std. während der Kokultivierung mit OP9-Zellen induziert (von Tag 3 auf Tag 4). Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert ($n=3$) \pm SD. Die Expressionswerte wurden gegen *Gapdh* und *Actb* normalisiert und in Relation zur Kontrolle (-HOXB4/-Runx1) gesetzt.

3.5. HOXB4 vermittelt eine Erhöhung der hämogenen Endothelvorläufer

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass eine ektope Expression von HOXB4 das hämogene Endothel expandierte (Abb. 32) und dass die Kolonien ohne *Runx1* Induktion immer größer wurden (Abb. 36). Deshalb stellte sich die Frage, ob jede Zelle im hämogenen Endothel das gleiche Potenzial aufweist. Wenn dies der Fall ist, sollte es möglich sein, dass HE zu expandieren. Außerdem sollte geklärt werden, ob innerhalb der HE-Kolonie, Zellen existieren, die bipotent sind, also HE-Strukturen und HSPZ hervorbringen können.

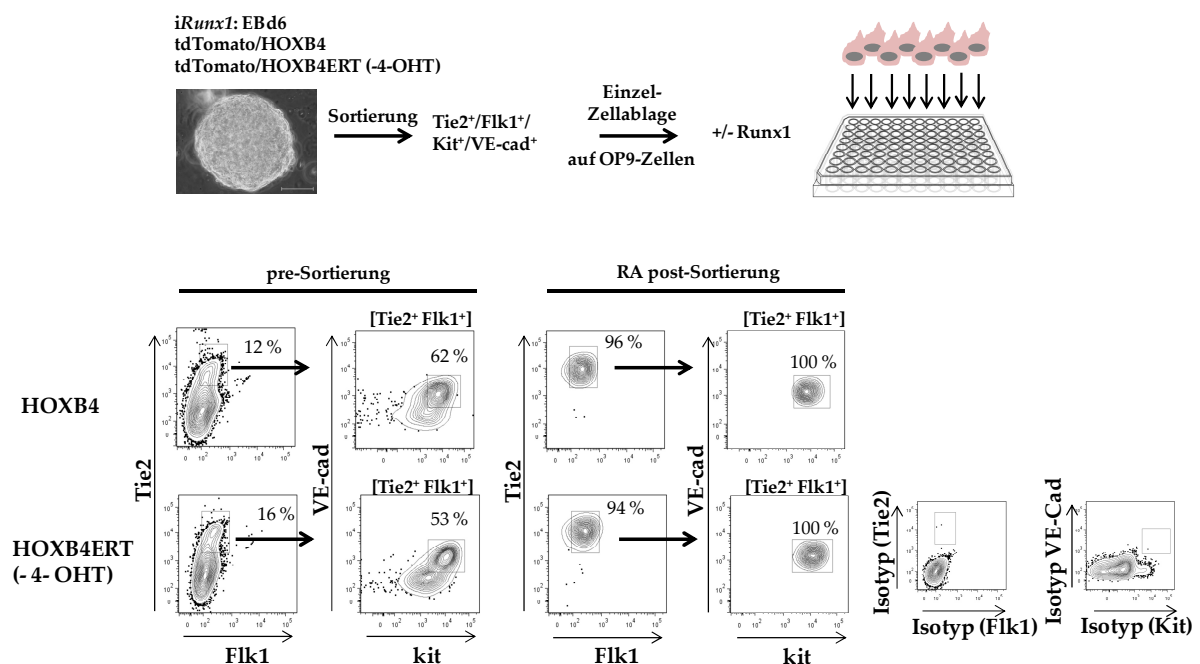


Abb. 39: Einzelzellablagen von *iRunx1* Tag 6 EBs

Zur Bestimmung der Frequenz von HE-Vorläuferzellen, die das Potenzial haben HE-Kolonien nach Einzelzellablagen auszubilden, wurden *iRunx1* Tag 6 EBs (tdTomato/HOXB4 und tdTomato/HOXB4ERT (-4-OHT)) dissoziiert, mit HE-assoziierten fluoreszenzmarkierten AK (Flk1-FITC, Kit-PE-Cy7, Tie2-APC, VE-cad-BV421) für die Durchflusszytometrie gefärbt und anschließend in 96er Lochbodenplatten mit 150 µl STFV-Medium als Einzelzellen abgelegt. In die 96er Lochbodenplatten wurden 2 Tage vor Sortierung 10.000 OP9-Zellen pro Vertiefung ausplattiert, damit diese zum Zeitpunkt der Einzelzellablage konfluent waren. Kultiviert wurden die Zellen bei 5 % CO₂, 3 % O₂, 37°C. Abk.: Reanalyse (RA).

In seriellen Replattierungsansätzen war gezeigt worden, dass HE-Kolonien (aus d6EB/OP9d3) nur zwei Mal replattiert werden können, also nur transiente Strukturen sind und aus Progenitorzellen entstehen. Die HE-Progenitorfrequenz wurde mit 1:12,5 (8/100) VE-cad⁺ Zellen bestimmt. Zwischen EB Tag 5 und 6 war dabei die

Frequenz mit 20 von 100 VE-cad⁺ abgelegten FMEV-HOXB4 transduzierten Zellen (1:5) am höchsten (L. Kasperidus, pers. Komm.). Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte die Frequenz der Progenitoren und deren Potenzial HSPZ hervorbringen zu können, ermittelt werden. Wie in Abb. 39 schematisch dargestellt, wurden für diese Fragestellung *iRunx1*-ESZ-abgeleitete Tag 6 EB-Zellen eingesetzt. Nicht induzierte tdTomato/HOXB4ERT Kontrollzellen (- 4-OHT) wurden mit der konstitutiven tdTomato/HOXB4 Variante verglichen. Wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, exprimierte das HE die Oberflächenmarker Flk1, VE-Cad, Kit und Tie2. Einzelzellen wurden mit OP9-Zellen kokultiviert, abgelegt und anhand der gelisteten Kriterien (HSPZ, HE, HSPZ + HE) ausgewertet (Abb. 40).

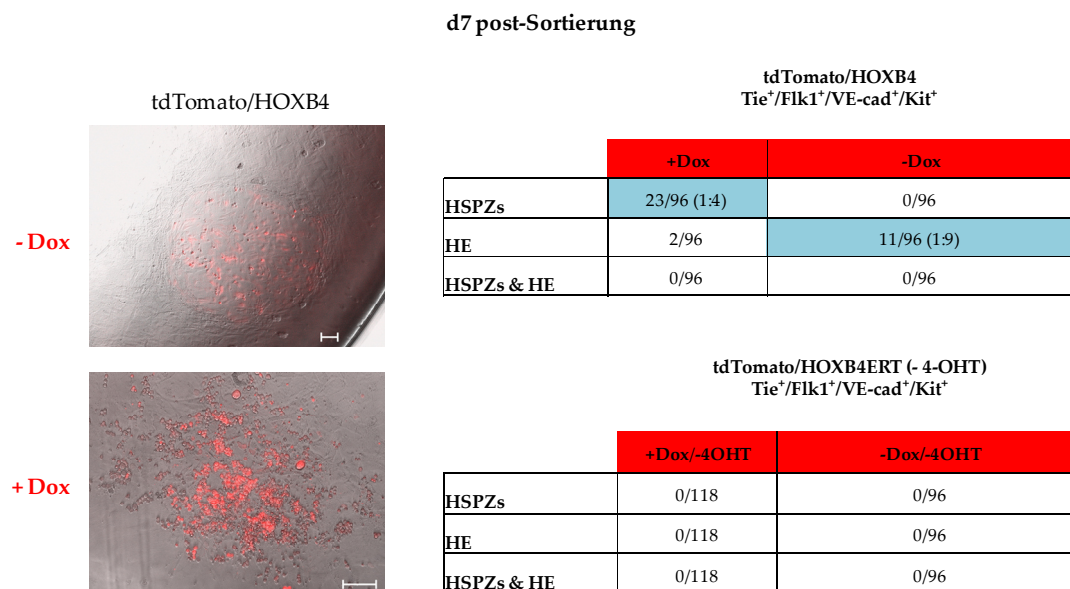


Abb. 40: Frequenzbestimmung des HE-Vorläufers aus Tag 6 EB

Einzelzellablagen

Sieben Tage nach der Ablage von Einzelzellen wurden die 96er Lochbodenplatten hinsichtlich der Entstehung von HSPZ und/oder HE-Kolonien untersucht und in +/- Dox Gruppen unterteilt. Der Unterschied zwischen einer HE-Kolonie (oben) und einem hämatopoetischen Zellcluster (unten), die beide aus tdTomato/HOXB4⁺ Einzelzellen entstanden sind, ist links neben den beiden Tabellen zu erkennen. Abbildungen: Maßstabsbalken: 100 µm, Phasenkontrast und überlagerte Fluoreszenzaufnahme (Overlay).

Unter *Runx1* Induktion ergab sich eine Frequenz von 1:4 (23/96 Einzelzellen). Ohne *Runx1* Induktion konnte eine Frequenz der HE-Progenitoren von 1:9 (11/96) ermittelt werden. Zu keinem Zeitpunkt konnte das Auftreten von HSPZ und HE-Kolonien zusammen in einer Vertiefung beobachtet werden. Aus der Kontrolle haben sich

weder hämatopoetische Zellen noch HE-Kolonien aus den abgelegten Einzelzellen entwickelt. Nur unter ektopter Expression von HOXB4 war es demnach möglich den Vorläufer des HEs (HE-Zellen, die sich nach *Runx1* Induktion umgewandelt hatten) bis zu einer Frequenz von 1:4 (25%) anzureichern.

3.5.1. Aus klonalen HE-Kolonien-abgeleitete hämatopoetische Zellen besitzen multipotentes und linienspezifisches Koloniebildungspotenzial

Ob und welche Qualität die HE-Vorläufer im hämatopoetischen CFC-Assay haben, sollte als nächstes geklärt werden. Für diesen Ansatz wurde ein HE-Progenitor Klon (#F1) in dem *Runx1* vor Einzelzellablage induziert worden war ausgewählt, um die entstandenen Suspensionszellen ($CD41^+CD45^+$ und $CD41^-CD45^+$) sortiert auf ihr hämatopoetisches Koloniebildungspotenzial zu überprüfen (Abb. 41).

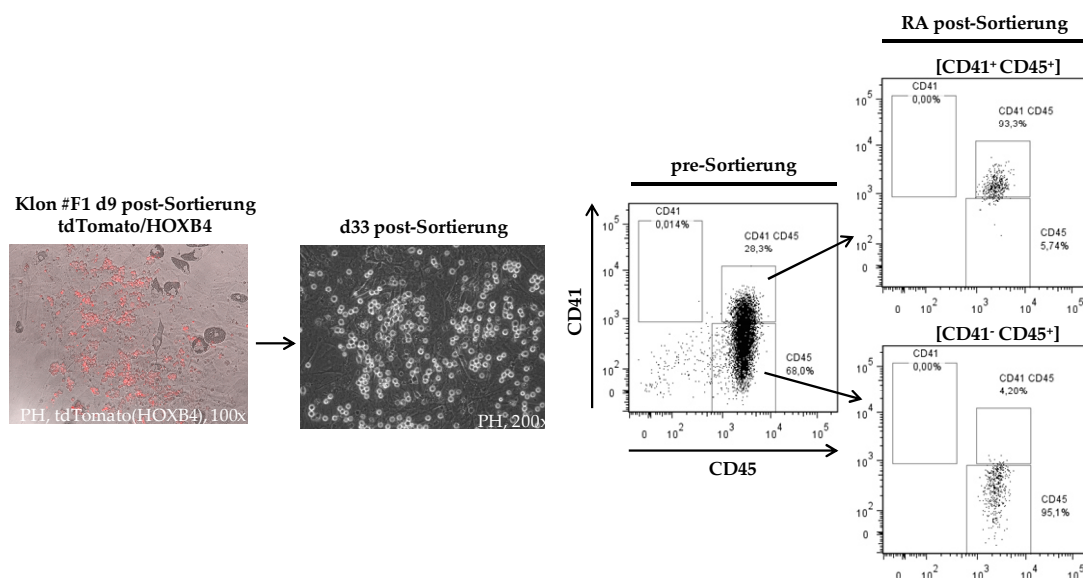


Abb. 41: Entstehung $CD41^+CD45^+$ und $CD41^-CD45^+$ Suspensionszellen aus einem HE-Progenitor Klon

Für den CFC-Assay wurden die hämatopoetischen Zellen des tdTomato/HOXB4⁺ #F1 Klons für weitere 33 Tage nach Sortierung auf OP9-Zellen kultiviert (28 Tage + Dox und 5 Tage - Dox) und anschließend im Durchflusszytometer die CD41 (APC) und CD45 (FITC) Expression untersucht. OP9-Zellen wurden anhand der Expression von CD140b mit Hilfe eines Anti-CD140b AKs markiert und von der Analyse ausgeschlossen. Für den CFC-Assay wurden beide Zellpopulationen $CD41^+CD45^+$ und $CD41^-CD45^+$ sortiert und jeweils in Triplikaten 500 Zellen pro Probe in Methylzellulose abgelegt und für weitere 12 Tage unter hypoxischen Bedingungen (5 % CO₂, 3 % O₂, 37°C) kultiviert. Abk.: Reanalyse (RA).

Dafür wurden die Zellen für 28 Tage nach Einzelzellablage auf OP9-Zellen unter *Runx1* Induktion und 5 Tage vor dem CFC-Ansatz ohne Dox gehalten, um die *Runx1* Expression wieder abzuschalten. Aus beiden Subpopulationen entstanden rote (BFU-E), weiße (CFU-M-, CFU-G-, CFU-GM) und gemischte (CFU-Mix) hämatopoetische Kolonien, mit tendenziell mehr multipotenten CFU-Mix- in der $CD41^+CD45^+$ Fraktion (Abb. 42). Wenn *Runx1* während der gesamten Zeit der Kokultivierung und während des CFC-Assays induziert wurde, konnten keine Unterschiede im Koloniebildungspotenzial der $CD41^+CD45^+$ und $CD41^-CD45^+$ Fraktionen festgestellt werden (Abbildung hier nicht gezeigt). Dass *Runx1* für den Erhalt dHSZ nicht durchgängig benötigt wird, konnte durch konditionelle Deletionsexperimente von *Runx1* herausgefunden werden [Tober *et al.* 2013].

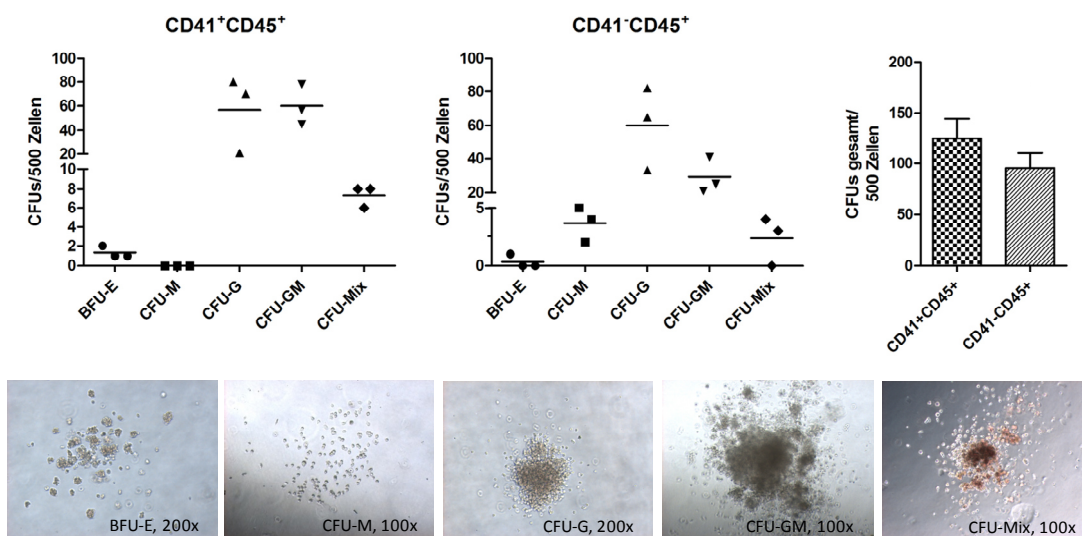


Abb. 42: Charakterisierung hämatopoetischer Kolonien im CFC-Assay

Nach 12 Tagen Inkubation bei 5% CO₂, 3% O₂ und 37°C wurden die aus den Subpopulationen ($CD41^+CD45^+$, $CD41^-CD45^+$) hervorgegangenen hämatopoetischen Kolonien in rote (BFU-E) weiße (CFU-M, CFU-G, CFU-GM) und gemischte (CFU-Mix) Kolonien eingeteilt (siehe Beispielskolonien, unten). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt. Jeder Punkt repräsentiert einen Ansatz mit 500 abgelegten Zellen. Die horizontale Linie stellt den arithmetischen Mittelwert von n=3 technischen Replikaten da. Im rechten Balkendiagramm ist die Gesamtzahl der Kolonien beider Fraktionen mit n=3 +/- SD gezeigt.

3.6. HOXB4 beeinflusst die hämatopoetische Differenzierung pluripotenter Stammzellen während des Übergangs vom Hämangioblasten zum hämogenen Endothel

Bisher konnte gezeigt werden, dass HOXB4 die Frequenz von HE-Vorläufern erhöht. Daher sollte geklärt werden, ob die Expansion der HE-Vorläufer auf eine Expansion von Hämangioblasten zurückzuführen ist. Die Frage sollte mit Hilfe des BL-CFC-Assays beantwortet werden.

3.6.1. HOXB4 beeinflusst nicht die Entstehung von Hämangioblasten

Die Zelle mit einem Blast-Kolonie Bildungspotenzial stellt das *in vitro* Äquivalent des Hämangioblasten dar und kann über dessen Flk1 Expression angereichert werden (siehe Übersichtsschaubild: Abb. 4). Der experimentelle Aufbau des BL-CFC-Assays ist in Abb. 43 dargestellt.

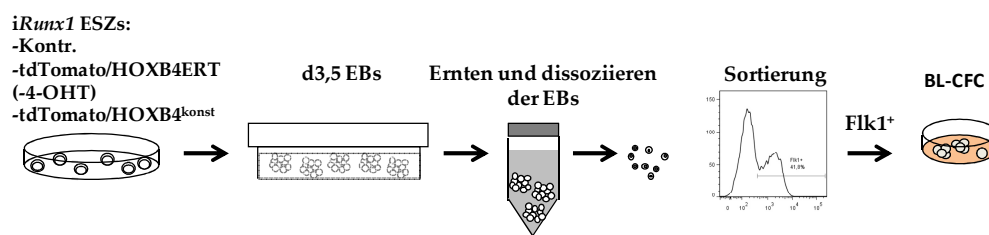


Abb. 43: Schema des BL-CFC-Assays

Die Graphik repräsentiert das experimentelle Design des BL-CFC-Assays. Ausgangspunkt sind die iRunx1-ESZ, die 3,5 Tage bei 5% CO₂ und 21% O₂ als EBs differenziert und anschließend dissoziiert wurden. Die vereinzelter EBs wurden nach Flk1⁺ Zellen sortiert und für 4-5 Tage bei 5% CO₂ und 3% O₂ im Hämangioblastenmedium kultiviert und morphologisch ausgewertet.

Die iRunx1-ESZ (nicht-transduziert (Kontr.), tdTomato/HOXB4ERT (- 4-OHT), tdTomato/HOXB4) wurden für 2 Tage an das Basismedium IMDM adaptiert und 5x10⁵ Zellen für 3,5 Tage bei 5% CO₂ und 21% O₂ differenziert (Abschnitt: 2.2.15). Danach wurden die EBs geerntet, dissoziiert und nach Flk1 Expression sortiert. Ektopes HOXB4 beeinflusste nicht die Flk1 Expression. Die Frequenz von Flk1⁺ Zellen ist in der HOXB4 Population niedriger (Abb. 44). Die Ergebnisse stimmen mit den zuvor analysierten Flk1 Expressionsdaten aus der EB-Differenzierung mit

Runx1^{Venus/+} ESZ überein (Abb. 23). Die Gesamtzellzahl der Flk1⁺ Zellen ist fast um die Hälfte niedriger im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 44).

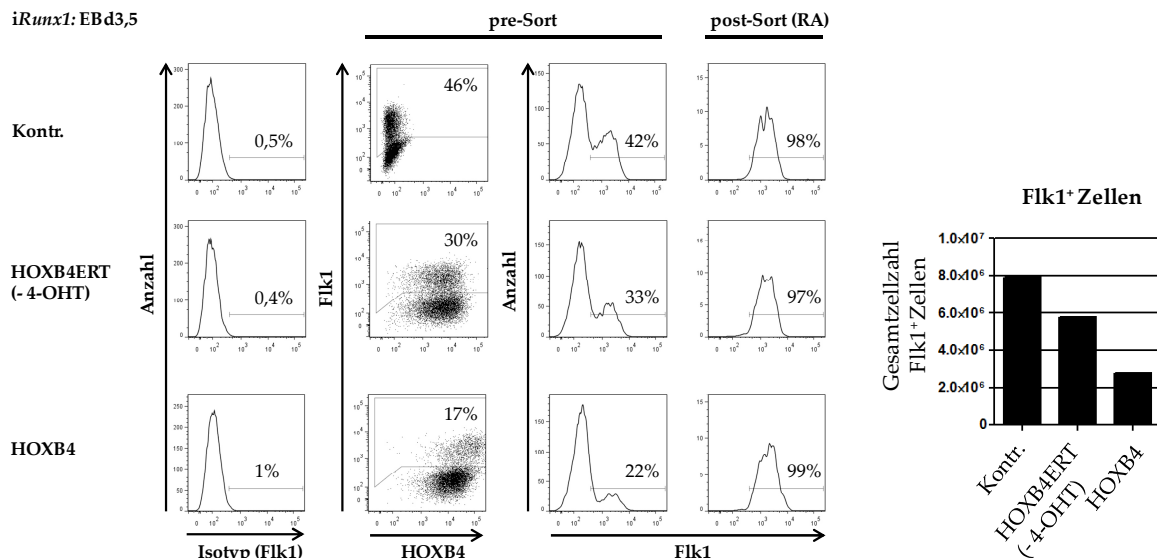


Abb. 44: Anreicherung Flk1⁺ Zellen für den BL-CFC-Assay

5×10⁵ *iRunx1*-Zellen (Kontr., tdTomato/HOXB4ERT (- 4-OHT), tdTomato/HOXB4) wurden für 3,5 Tage in den EB-Differenzierungsansatz eingesetzt. Danach wurden die EBs vereinzelt und die Zellen für die Sortierung mit einem Flk1-APC-konjugierten AK gefärbt. Unter hypoxischen Konditionen (5 % CO₂, 3 % O₂, 37°C) erfolgte jeweils in Triplikaten die Inkubation für insgesamt fünf Tage. Nach 5 Tagen wurden die Kolonien anhand der Morphologie dem Blast-Kolonie- (Hämangioblasten) oder dem sekundären Kolonie Typ zugeordnet (sek. EB).

5×10⁵ Flk1⁺ Zellen wurden bei 5% CO₂, 3% O₂ und 37°C in Triplikaten im semisoliden Hämangioblastenmedium (Abschnitt: 2.1.6) kultiviert und anschließend anhand der Morphologie ausgewertet (Abb. 45). Eingeteilt wurden die Kolonien in den traubenartigen Blasten-Kolonietypp (Hämangioblast) oder dem eher kompakten sekundären EB-Kolonietypp. Die Anzahl der Blasten-Kolonien war in konstitutiv HOXB4 exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nicht vermehrt. In den HOXB4ERT Kontrollzellen (- 4-OHT) konnte eine geringe Zunahme der Blast-Kolonien festgestellt werden. Eine Hintergrundaktivität des HOXB4ERT Fusionsproteins kann nicht ausgeschlossen werden. Geringe Mengen von HOXB4, die in den Kern gelangen, können eventuell zu mehr Blasten-Kolonien führen, was für einen Dosisseffekt des Transkriptionsfaktors sprechen würde. Das anschließende Ergebnis (Abb. 46) stützt dieses Argument aber nicht (es entstehen nicht mehr HE-Kolonien aus HOXB4ERT transduzierten Kontrollzellen (- 4-OHT) im Vergleich zu

konstitutiv HOXB4 exprimierenden Zellen). In allen vorherigen Experimenten konnte auch kein Unterschied zwischen nicht-transduzierten (Kontr.) und nicht aktivierten HOXB4ERT Zellen (- 4-OHT) festgestellt werden. In der Anzahl des sek. EB-Kolonietyps konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Kulturen ermittelt werden. Eine vermutete Expansion des Hämangioblasten, als Grund für die HOXB4-vermittelte Anreicherung des HE-Progenitors, konnte hier nicht bestätigt werden.

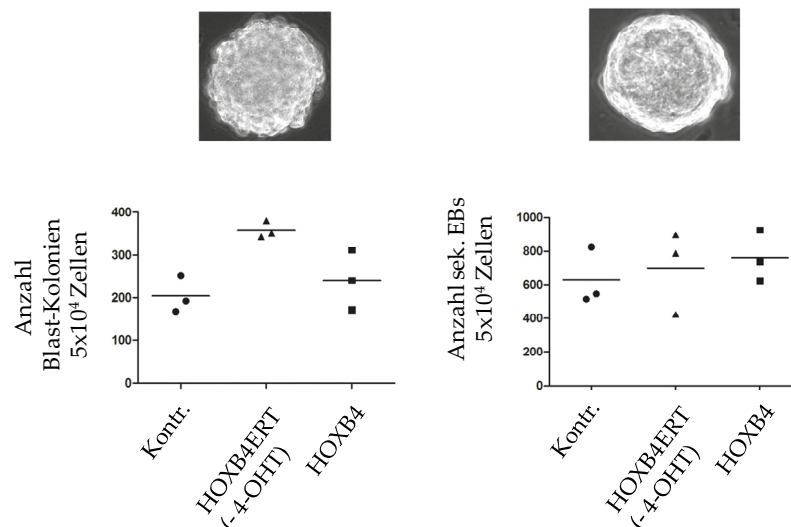


Abb. 45: Bestimmung des Hämangioblastenpotenzials

Auswertung des BL-CFC-Assays. Morphologische Einteilung der Kolonien in einen Blast- oder sek. EB-Typ in *iRunx1*: Kontr., *Hoxb4^{konst}* und HOXB4ERT (- 4-OHT) Zellen. In Triplikaten wurden 5x10⁴ Zellen in 1 ml semisolidem Medium für 5 Tage ausgesät. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert als horizontale Linie.

3.6.2. HOXB4 verändert das Hämangioblasten-Potenzial

Nachdem gezeigt wurde, dass die BL-CFC Frequenz von FMEV-HOXB4 transduzierten Zellen in etwa gleich blieb, hingegen die HE-Progenitor-Frequenz aber stark erhöht war, stellte sich die Frage, ob die Differenzierung des Hämangioblasten verändert sein könnte. Es sollte geklärt werden, ob das Potenzial des bipotenten Hämangioblasten durch die ektope Expression von HOXB4 verändert wurde. Deshalb wurden alle Kolonien der jeweiligen Probe aus dem BL-CFC-Assay geerntet, dissoziiert und 5x10⁴ Zellen auf OP9-Zellen kultiviert. Von 5x10⁴ ausplattierten FMEV-tdTomato/HOXB4 transduzierten Zellen haben sich 7,24% zu HE-Kolonien entwickelt (3624 Kolonien/5x10⁴) versus 0,058% der Kontrollzellen

(nicht-transduzierte Zellen (Kontr.): 29 Kolonien, HOXB4ERT (- 4-OHT): 26 Kolonien) (Abb. 46A). Eine ektope HOXB4 Expression führte zu > 130-fach mehr hämogenen Endothel im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne zuvor den Hämangioblasten zu vermehren. Um herauszufinden, ob die Zellen die Fähigkeit besitzen strukturelles Endothel zu bilden, wurde ein Teil der dissoziierten BL-CFC-Kolonien in den Tube-Assay überführt. Zellen mit ektope HOXB4 Expression schienen im Vergleich zu den Kontrollen nicht die Art der tubulären Strukturen auszubilden, die sonst typisch für strukturelles Endothel sind, nämlich ein verzweigtes Netzwerk über Schlaufen und Knotenpunkte zu bilden (Abb. 46B). Konstitutiv HOXB4 exprimierende Zellen verteilten sich eher diffus im Matrigel und prägten keine klar abzugrenzenden tubulären Strukturen aus.

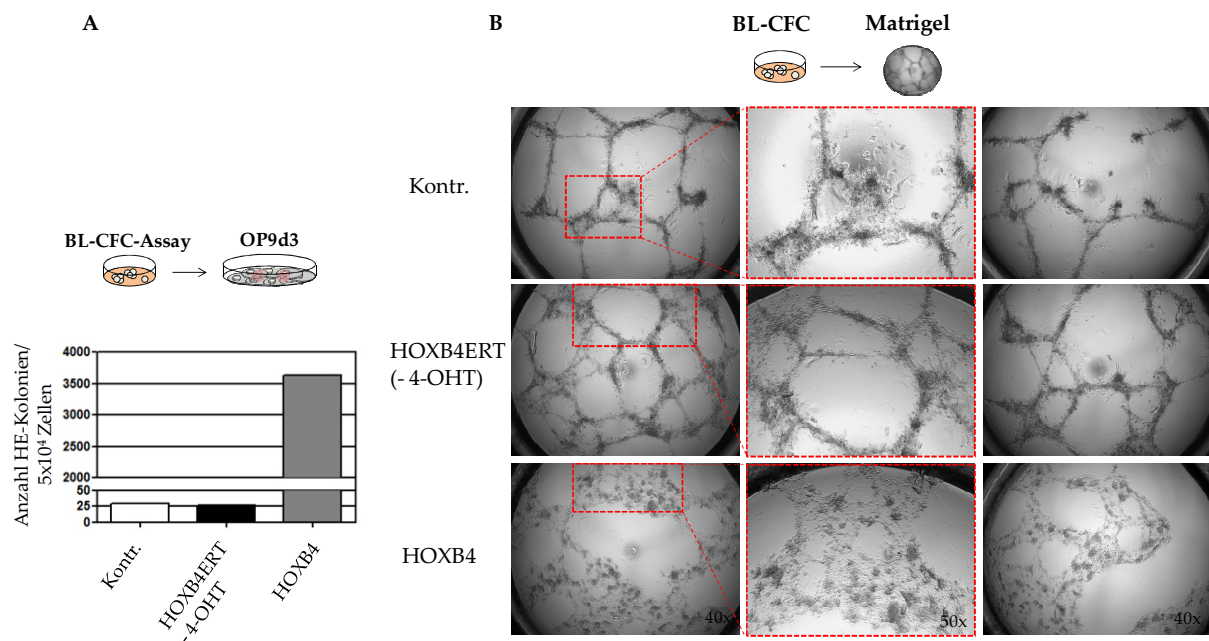


Abb. 46: Quantifizierung von HE-Kolonien und Charakterisierung der Ausbildung tubulärer Strukturen im Matrigel

Die Zellen des BL-CFC-Assays wurden aufgeteilt. Ein Teil wurde mit OP9-Zellen kokultiviert (A) und der andere Teil in den Angiogeneseversuch überführt (B). **(A)** Bestimmung des HE-Potenzials von dissoziierten Blast-Kolonien nach dreitägiger Kokultivierung mit OP9-Zellen. Nicht-transduzierte (Kontr.), HOXB4ERT (- 4-OHT)) und FMEV-HOXB4 transduzierte Zellen wurden gesammelt, die Kolonien trypsiniert und 5×10^4 Zellen in Einfachbestimmung für drei Tage unter hypoxischen Bedingungen (5% CO₂, 3% O₂, 37°C) auf OP9-Zellen kultiviert. **(B)** Parallel wurden 4×10^4 Zellen in Doppelbestimmung auf Matrigel gesetzt und die Ausbildung tubulärer Strukturen morphologisch nach 19 Std. Inkubation bei 5% CO₂, 3% O₂ und 37°C beurteilt. In der ersten und dritten Spalte sind die jeweiligen Duplikate mit einer 40x Vergrößerung dargestellt. In der Mitte ist eine Vergrößerung (50x) des Ausschnitts aus dem Bild der ersten Spalte gezeigt (rote Umrandung).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von HOXB4 auf wichtige Eckpunkte der Hämatopoese während der Differenzierung pluripotenter Stammzellen studiert. Ausgehend von dem "klassischen" Modell der embryonalen Hämatopoese konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Homöodomäne Transkriptionsfaktor HOXB4 im bipotenten Hämangioblasten das Zellschicksal in Richtung hämogenes Endothel treibt und im Anschluss die hämatopoetische Entwicklung, zusammen mit Runx1, vorantreibt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HOXB4 eine Zellschicksalsdeterminante im Hämangioblasten sein könnte, indem es die Differenzierung in Richtung Hämatopoese (hämogenes Endothel) auf Kosten der Angiogenese schiebt und wie eine Art „molekularer Schalter“ arbeitet.

4.1. Einfluss von HOXB4 in der frühen Phase der Mesodermentwicklung

Wegen ihrer Eigenschaft, bei der *in vitro* Differenzierung als "*Embryoid Bodies*" (EBs) die frühen Entwicklungsprozesse in zeitlich ähnlicher Abfolge abzubilden, wie sie während der Embryogenese, *in vivo*, ablaufen, eignen sich ESZ hervorragend als Modellsystem für das Verständnis von Spezifikationsprozessen der frühesten Embryonalentwicklung. Um den frühesten Zeitpunkt und die "Zielzelle" der Hämatopoese-fördernden Aktivität von HOXB4 besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit zwei ESZ-Linien eingesetzt, die als Reporter für die Mesodermspezifikation, *Bry*^{GFP/+}, und für die Spezifikation definitiver hämatopoetischer Stammzellen (*Runx1*^{Venus/+}) dienten. Wie sich herausstellte, hat der TF keinen Einfluss auf Verlauf und Expression von *Bry*. Im Gegensatz dazu konnten aber während der EB-Differenzierung Unterschiede in der späteren Expression von *Flk1*, *Runx1*, *Gata2* und *Scl* gezeigt werden. Innerhalb der 6-tägigen EB-Formation war die Expression dieser hämatopoetischen Schlüsselregulatoren in konstitutiv HOXB4 exprimierenden Zellen verzögert. In einer der ersten größeren Untersuchungen von HOXB4 Zielgenen mit adulten HSZ und ESZ-HSZ war gezeigt

worden, dass eine induzierte HOXB4 Aktivität den *Fibroblast growth factor* (FGF)-Signalweg moduliert, indem es die Transkription von Aktivatoren (*Etv5*) herunterreguliert und von Inhibitoren (*Dusp6* und *Spry1*) hochreguliert [Schiedlmeier *et al.* 2007]. Der FGF-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Mesodermspezifikation [Yamaguchi *et al.* 1994, Ciruna and Rossant 2001]. Mausembryonen mit einem homozygoten *knock-out* des *Fibroblast growth factor-receptors-1* (*Fgfr1*) sterben zum Zeitpunkt der Gastrulation und weisen starke Veränderungen im Aufbau des Mesoderms auf [Deng *et al.* 1994, Yamaguchi *et al.* 1994]. Mittels *fgfr1*^{-/-} ESZ-abgeleiteten EBs konnte gezeigt werden, dass *Bry* zwar immer noch exprimiert wurde, die Expression von *Flk1*, *Scl* und *Kit* allerdings auf Kosten der hämatopoetischen Entwicklung vermindert war [Faloon *et al.* 2000]. Dies würde auch die in dieser Arbeit beobachtete verzögerte Expression von *Flk1*, *Scl*, *Gata2* und *Runx1* während der Differenzierung von HOXB4 transduzierten ES-Zellen erklären. Für die später erfolgende Spezifikation hämatopoetischer Vorläufer wird der FGF-Signalweg nicht benötigt. Aktives FGF-Signaling wirkt sich sogar eher negativ auf die Entwicklung des hämatopoetischen Systems aus. Im Kükenembryo konnte beobachtet werden, dass eine hohe FGF-Aktivität die primitive Hämatopoese inhibierte und stattdessen das endotheliale Zellschicksal forcierte [Nakazawa *et al.* 2006]. Ein kompletter Block des FGF-Rezeptors zwischen Tag 4 und 6 der Entwicklung von Maus EBs mittels chemischer Inhibitoren führte auch zu einer weiteren Verstärkung des bereits durch HOXB4-vermittelten Potenzials gemischte hämatopoetische Kolonien (CFU-Mix) zu bilden [Schiedlmeier *et al.* 2007]. In einem induzierbaren, transgenen Zebrafischmodell, in dem die FGF-Signalübertragung außer Kraft gesetzt oder verstärkt werden konnte, wurde deutlich, dass der *Fgfr1* ebenfalls für die Spezifikation des hämogenen Endothels (HE) verantwortlich ist. Ein Verlust des FGF-Signalwegs ging mit einer Ausweitung der *Runx1* Expression innerhalb der Dorsalen Aorta von ventral nach dorsal und einer erhöhten Anzahl an HSZ einher [Pouget *et al.* 2014]. Mechanistisch könnte dies über ein Fehlen der FGF-

vermittelten Modulation der lateralen Notch-Signaltransduktion vermittelt werden [Saravanamuthu *et al.* 2009].

Der Notch-Signalweg ist sowohl in der Maus, als auch im Zebrafisch für die arterielle Endothel- und HSZ- Spezifikation notwendig [Lawson *et al.* 2001, Burns *et al.* 2005, Rowlinson and Gering 2010]. Von den vier Notch-Varianten in Vertebraten [Bigas *et al.* 2010] werden nur Notch1 und Notch4 in Endothelzellen in der AGM Region exprimiert. Notch1 ist dabei essentiell für die Entwicklung von HSZ aus dem hämogenen Endothel [Kumano *et al.* 2003]. Passend zu dieser Beobachtung wurde nach HOXB4 Induktion, neben der Inhibition des FGF-Signalwegs, auch eine erhöhte Expression der Notch-Liganden Dll1 und Dll3 und von Notch-Zielgenen (*Hey2*, *Nrarp*, *Skp2*) festgestellt [Schiedlmeier *et al.* 2007]. Der Notch/FGF Signalweg ist daher höchstwahrscheinlich bei der HOXB4-vermittelten Verstärkung der Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen beteiligt. Von besonderem Interesse ist dabei das potenzielle Zusammenwirken des Notch-Signalwegs mit der Aktivität von HOXB4 deshalb, weil Notch-Rezeptoren und dessen Liganden in Endothel- und hämatopoetischen Zellen exprimiert werden [Del Amo *et al.* 1992, Uyttendaele *et al.* 1996, Ohishi *et al.* 2003] und der Notch-Signalweg durch „laterale Spezifikation“ (laterale Inhibition) das Zellschicksal von benachbarten Zellen bestimmen kann [Wilkinson *et al.* 1994]. Eine erniedrigte Notch-Aktivität führte in Zebrafischembryos zu mehr Endothelzellen bei einem gleichzeitigen Verlust der Erythrozyten, vermutlich hervorgerufen durch einen Zellschicksalswechsel in frühen Endothelvorläufern im Mesoderm [Lee *et al.* 2009].

Als eines der wichtigsten Zielgene des Notch-Signalwegs wurde interessanterweise *Runx1* identifiziert [Burns *et al.* 2005]. Eine erhöhte *Runx1* Expression ist für die Entstehung von dHSZ aus dem hämogenen Endothel notwendig [North *et al.* 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einer Subpopulation von endothelialen Zellen, die *Runx1* niedrig exprimierten, HOXB4 zu einer erhöhten Expression und in der Folge zu einer Transition zu hämatopoetischen Zellen führte.

4.2. HOXB4-vermittelte Anreicherung des hämogenen Endothels

Ektopische Expression von HOXB4 führte zu einem starken Anstieg der Zahl an HE-Kolonien. Die plattenartig, rund wachsenden Kolonien wurden zunächst als Endothel charakterisiert und ihre Funktionalität klonal getestet. Etwa 1:9 einzeln abgelegte Flk1⁺Tie2⁺VE-Cad⁺Kit⁺ Tag 6 iRunx1 Zellen ohne aktives *Runx1* wiesen Koloniebildungspotenzial auf. Unter Induktion der *Runx1* Expression konnten in keinem Fall einzeln abgelegter Zellen sowohl endotheliale als auch hämatopoetische Kolonien gefunden werden. Daher besitzt das hämogene Endothel kein bipotentes Potenzial und entspricht somit nicht dem Hämangioblasten. Dass die Frequenz hämatopoetischer Cluster unter *Runx1* Induktion mit 1:4 höher war als das Koloniebildungspotenzial ohne *Runx1* (1:9) lässt darauf schließen, dass die Zellen schon frühzeitig während der Differenzierung als HE spezifiziert werden müssen. Wenn eine Zelle hämogen determiniert ist, verliert sie während der Differenzierung ihre endotheliale Identität und kann daher keine Kolonien bilden. Funktionelle Analysen mit *Runx1* +23 Enhancer Reporter (23GFP⁺) Zellen hatten gezeigt, dass das hämatopoetische transkriptionelle Programm bereits zwei Tage vor Entstehung von HSZ von Zellen der Endothelwand initiiert wird. Die Expression von *Meis1*, *Gata2*, *Gata3* und *Scl* wurde in 23GFP⁺ HE-Zellen bereits zum Zeitpunkt E8,5 am höchsten exprimiert, etwa 2 Tage vor Einleitung der EHT infolge erhöhter *Runx1* Expression. Parallel dazu nahm das endotheliale Potenzial dieser Zellen ab [Swiers *et al.* 2013a].

In globalen Genexpressions- und ChIP-Seq Analysen konnte gezeigt werden, dass HOXB4, neben *Runx1*, mit drei weiteren TF zusammen agiert, nämlich *Flt1*, *Scl* und *Meis1* [Fan *et al.* 2012]. *Meis1* ist insbesondere interessant, weil dieser TF als HOX-Kofaktor direkt mit HOXB4 interagiert [Ravasi *et al.* 2010]. *Meis1* wird ebenfalls im lateralen Plattenmesoderm exprimiert und *knock-out* Mäuse sterben zwischen Tag E11,5 und 14,5 aufgrund eines Defekts der definitiven Hämatopoese und der Gefäßbildung [Azcoitia *et al.* 2005]. *Meis1* könnte daher bei der HOXB4-vermittelten Spezifikation des HEs eine wichtige Funktion übernehmen, indem es über die

direkte Interaktion mit HOXB4 das transkriptionelle Programm des Hämangioblasten so verändert, dass das Zellschicksal in Richtung HE getrieben wird.

Ein wichtiges Indiz dafür, dass HOXB4 als Schicksals-Determinante bei der Spezifizierung von Hämangioblasten wirkt, lieferte der BL-CFC-Assay in Kombination mit einem daran anschließenden HE-Assay. Wir konnten zeigen, dass eine konstitutive Expression von HOXB4 die Anzahl der Blast-Kolonien nicht erhöhte, jedoch das Differenzierungsverhalten des bipotenten Hämangioblasten veränderte. Aus Blast-Kolonien entstanden 130-fach mehr HE-Strukturen wenn HOXB4 ekto exprimiert wurde (s. Ergebnisse, Abb. 46).

Das ebenfalls zu den Homöotischen Selektor-Transkriptionsfaktoren gehörende HoxA3 ist auch ein „apikaler“ Regulator des HE, verhindert aber im Gegensatz zu HOXB4 die Initiation des hämatopoetischen Programms, *in vitro* und *in vivo* [Iacovino et al. 2011]. HoxA3 inhibiert die Expression von *Runx1* offenbar durch direkte Bindung an die Region 5' des proximalen P2 *Enhancers*. Als Folge unterdrückt HoxA3 indirekt auch die Expression der *Runx1* Zielgene *Gata1*, *Gfi1b*, *Ikaros*, *Pu.1* und *Phemx* und unterdrückt damit das hämatopoetische Programm. Dass dies der Hauptmechanismus ist, über den HoxA3 die Hämatopoese unterdrückt, wurde mittels Überexpression von *Runx1* gezeigt, bei der die durch HoxA3 verursachte Repression wieder aufgehoben wurde [Iacovino et al. 2011]. Dass HOXB4 dagegen die *Runx1* Expression verstärkt und damit HE-Zellen instruiert die EHT zu durchlaufen und gleichzeitig die Bildung des strukturellen Endothels aus dem Hämangioblasten inhibiert (s. Ergebnisse, Abb. 46), weist auf einen funktionellen Antagonismus der beiden HOX-TFs hin. Passend zu diesem Ergebnis konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung von HOXB4 am distalen P1 Promotor von *Runx1* mit einer Hypomethylierung des P1 Promotors und der Entstehung von hämatopoetischen Zellen (Kit⁺CD45⁺) korrelierte [Webber et al. 2013]. Ein möglicher genereller Mechanismus bei der Regulation des Zellschicksals des Hämangioblasten könnte daher sein, dass HOXB4 (oder sogar generell alle HOX4-Paraloge) und

HoxA3 (bzw. alle Hox3 Paraloge) in der Runx1 Promoterregion antagonistisch agieren.

Problematisch bei diesem Modell ist, dass die Existenz des Hämangioblasten bis heute kontrovers diskutiert wird und als eigenständige, klonale *in vivo* Entität noch nicht bestätigt werden konnte [Ueno and Weissman 2006]. Das binäre Potenzial des Hämangioblasten könnte vielmehr ein "*state of competence*" des hämogenen Endothels sein [Myers and Krieg 2013]. Das würde bedeuten, dass sich das Potenzial des HE-Vorläufers nur unter bestimmten extrinsischen und/oder intrinsischen Bedingungen ändert. Klonalitätsanalysen während der Embryonalentwicklung im Mausembryo stützen vielmehr ein Konzept der separaten Spezifikation von Blut- und Endothelzellen, ohne bipotenten Hämangioblast als Zwischenstufe [Padron-Barthe *et al.* 2014]. Die Beziehung zwischen endothelialen und hämatopoetischen Zellen würde demnach nicht über einen bipotenten Hämangioblasten verlaufen, sondern über frühe Endothelvorläufer, die während der embryonalen Entwicklung instruiert werden, sich entweder zu strukturellem oder hämogenem Endothel zu entwickeln.

4.3. Auswirkung von HOXB4 auf die Expression von *Runx1*

Mit Hilfe der *iRunx1*^{-/-} Zellen konnte gezeigt werden, dass HOXB4 zusammen mit Runx1 früheste CD41⁺CD45⁺ HSZ expandiert, die weiter in CD41⁺CD45⁺ Zellen ausreifen. Meine Ergebnisse unter Verwendung der *Runx1*^{Venus/+} ESZ-Linie deuten auf eine notwendige Basisexpression von *Runx1* in HE-Zellen hin, welche erst die hämatopoetische Transition einleiten. Aus einer Subpopulation von Zellen mit einer basalen *Runx1* Expression (*Runx1*^{int}) entwickelte sich durch die HOXB4 Aktivität eine *Runx1*^{hi} Fraktion, die CD41⁺ und CD45⁺ exprimierte. *In vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Verlust von Runx1 zu einem kompletten Block der Entstehung von dHSZ an allen hämatopoetischen Stellen im Maus Embryo führt [Swiers *et al.* 2010]. Die Spezifikation des HEs ist dabei nicht betroffen, sondern erst die Transition des hämogenen Endothels zu dHSZ, die *endothelial-to-hematopoietic transition* (EHT)

[North *et al.* 1999, Lancrin *et al.* 2009]. Das lässt vermuten, dass Runx1 zwar nicht für die Spezifikation des HEs verantwortlich ist, aber die Kompetenz zur nachfolgenden EHT vermittelt und währenddessen aktiv sein muss [Chen *et al.* 2009]. Das würde mein Ergebnis erklären, weshalb eine Basisexpression von *Runx1* Voraussetzung für die Erhöhung der *Runx1* Expression ist (s. Ergebnis, Abb. 27). Der Zeitpunkt der Detektion erster *Runx1* exprimierender Zellen blieb während der EB-Differenzierung unverändert: zwischen Tag 2 und 4 konnten Flk1⁺*Runx1*⁺ Zellen detektiert werden, in Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen [Hirai *et al.* 2005]. Eine Fraktion von *Runx1*^{hi} Zellen und nachfolgende Expansion von CD41⁺CD45⁺ Zellen konnte aber nur bei ektopter HOXB4 Expression beobachtet werden. Somit konnte ich erstmals zeigen, dass HOXB4 in die Regulation der *Runx1* Expression eingreift.

Die Transkription von *Runx1* wird von zwei verschiedenen Promotoren, den proximalen P2 und distalen P1 Promotor gesteuert [Ghozi *et al.* 1996, Pozner *et al.* 2007, Sroczynska *et al.* 2009] und darüber die beiden Isoformen *Runx1b* (proximal) bzw. *Runx1c* (distal) exprimiert. Das proximale *Runx1b* Transkript ist in HE Zellen exprimiert, wobei die *Runx1c* Isoform transkribiert wird, sobald die HE-Zellen die Transition zu hämatopoetischen Zellen initiieren und somit die definitive Hämatopoese beginnt. Mit dem Beginn der Transkription von *Runx1c* vom P1 Promotor wird Tie2 runter reguliert wobei die Zellen ihr endotheliales Erscheinungsbild verlieren und den Pan-Leukozytenmarker CD45 exprimieren. [Sroczynska *et al.* 2009]. Meine Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass HOXB4 eine wesentliche regulatorische Bedeutung bei der Determination des hämogenen Endothels als definitive hämatopoetische Stammzelle spielt, indem es die Weichen beim Übergang von der primitiven zur definitiven Hämatopoese stellt. Wie bereits vorhin erwähnt, bindet HOXB4 in der Tat am distalen P1 Promoter. Ob HOXB4 direkt oder indirekt über die DNA-Demethylierung des P1 Promotors den Übergang einleitet und dadurch die basale Expression von *Runx1* hochreguliert, bleibt zu klären.

4.3.1. Einfluss von Runx1 auf die Weiterentwicklung von CD41⁺ Zellen zu HSZ

Durch die Möglichkeit einer unabhängigen Induktion von *Runx1* und HOXB4 in den *iRunx1* Zellen konnte der Einfluss von Runx1 und HOXB4 auf die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen separat voneinander evaluiert werden. Es bestätigte sich dabei, dass Runx1 für die weitere Ausreifung von CD41⁺ zu CD45⁺ Zellen essentiell ist [Liakhovitskaia *et al.* 2014]. Eine länger andauernde Induktion der *Runx1* Expression erhöhte dabei den Anteil an reifen CD45⁺ Zellen. Interessanterweise entwickelte sich auch ohne *Runx1* Induktion eine CD41 exprimierende Zellpopulation, sowohl in konstitutiv HOXB4 exprimierenden Zellen als auch in den Kontrollen ohne HOXB4 Aktivität (HOXB4ERT -4-OHT) bzw. in nicht-transduzierten Zellen, allerdings mit nur niedriger Expressionshöhe (CD41^{lo}). Mit großer Wahrscheinlichkeit sind dies primitive hämatopoetische Zellen deren Entwicklung unabhängig von Runx1 verläuft [Ferkowicz *et al.* 2003]. Die Entstehung definitiver, CD41^{hi} hämatopoetischer Zellen ist dagegen abhängig von Runx1 [Okuda *et al.* 1996, Sasaki *et al.* 1996, Wang *et al.* 1996, Ferkowicz *et al.* 2003].

4.4. Wie forciert HOXB4 die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen?

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass HOXB4 das Differenzierungsverhalten von Hämangioblasten in Richtung HE verschiebt, wahrscheinlich auf Kosten der endothelialen Entwicklung. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HOXB4 auch die Expression von *Runx1* reguliert, indem es eine bereits vorhandene, basale Expression von *Runx1* im HE noch weiter steigert und dadurch die Zellen in die Lage versetzt, die Transition von Endothel zu Hämatopoese (EHT) verstärkt zu durchlaufen. Abb. 47 fasst die Ergebnisse graphisch zusammen. HOXB4 scheint daher als „molekularer Schalter“ zu wirken, der das Programm der definitiven Hämatopoese auf Kosten des strukturellen Endothels anschaltet.

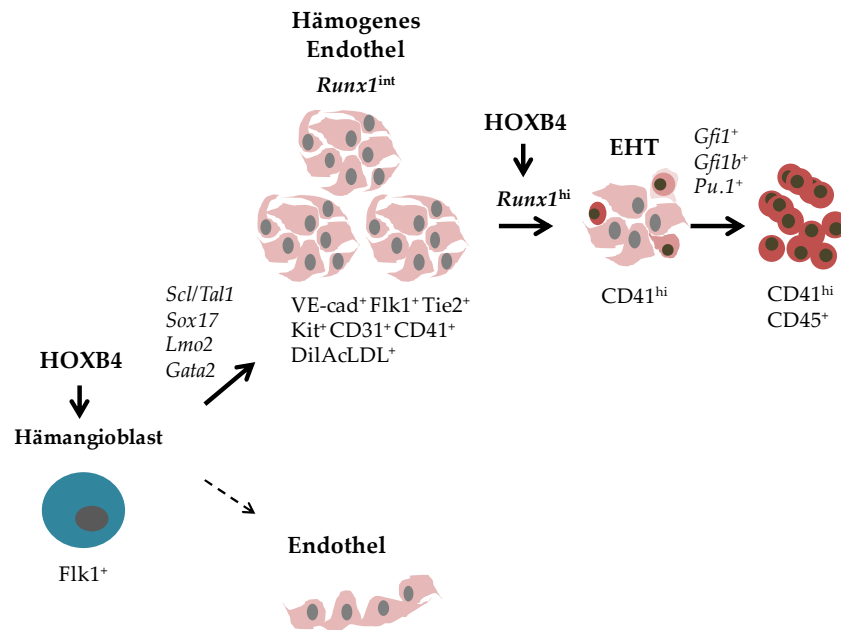


Abb. 47: Modell zum Einfluss von HOXB4 auf die hämatopoetische Differenzierung.

In diesem Modell sind die Ergebnisse zur HOXB4-vermittelten Regulation der hämatopoetischen Differenzierung von ESZ zusammenfassend dargestellt. Abk.: EHT: Endothel-zu-Hämatopoese Transition (*endothelial-to-hematopoietic transition*).

4.5. Ausblick

Bezüglich der weiteren funktionellen Aufklärung der Rolle von HOXB4 bei der Spezifikation des hämogenen Endothels ergibt sich die Frage wie HOXB4 mechanistisch das Zellschicksal des Hämangioblasten verändert. Die Identifizierung direkter Interaktionspartner und die Aufklärung der zugrundeliegenden transkriptionellen Regulation durch HOXB4 in hoch angereicherten Hämangioblasten sollte ein genaueres Verständnis über den Wirkmechanismus des TF bei der Zellschicksalsentscheidung liefern. Auf der Basis von Transkriptomanalysen könnten u.a. auch neue Zielgene gefunden werden, deren Genprodukte eine wesentliche stärkere Anreicherung oder sogar reine Darstellung der entscheidenden Zielzellen von HOXB4 mittels Immunfärbung und Durchflusszytometrie erlaubt, also den (mutmaßlichen) Hämangioblasten bzw. HE-Progenitoren.

Eine andere Frage, die sich aus meiner Arbeit ergibt, ist, ob endogenes HOXB4 bzw. die HOX4 Paralogen für die Entwicklung des hämogenen Endothels essentiell sind.

Bisher war es technisch nicht möglich, diese Frage durch gezieltes Ausschalten aller 4 paralogen Gene zu beantworten. Mit Hilfe der Entwicklung der CRISPR/Cas Technologie ist die Beantwortung der Frage nun realistisch geworden [Harrison *et al.* 2014].

Falls die Ergebnisse dieser Arbeit auf pluripotente Stammzellen des Menschen übertragbar sind, könnten eventuell in Zukunft, transplantierbare, patientenspezifische HSZ aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) *in vitro* generiert werden.

5. Zusammenfassung

Die Identifizierung molekularer Mechanismen, die während der *in vitro* Differenzierung pluripotenter Stammzellen das hämatopoetische Zellschicksal regulieren, ist Voraussetzung für eine gerichtete und effiziente Generierung hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) und deren künftigen Einsatz im Rahmen der somatischen Gen- und Zelltherapie. *In vitro* können bisher HSZ mit Langzeit-Repopulationspotenzial nur dann generiert werden, wenn der Homöodomäne Transkriptionsfaktor (TF) HOXB4 während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESZ) der Maus, ektop exprimiert wird. Die „Zielzelle“, in der HOXB4 seine Hämatopoese-fördernde Wirkung während der Differenzierung entfaltet und die zugrunde liegenden Mechanismen seiner Aktivität in dieser Zelle sind bisher unbekannt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde HOXB4 konstitutiv oder als Tamoxifen-induzierbares Fusionsprotein mit der hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors (ERT2) retroviral in verschiedenen Maus ESZ-Linien exprimiert, um dessen Einfluss auf die Schicksalsentscheidungen während der hämatopoetischen Differenzierung zu untersuchen. Um die Wirkung von HOXB4 auf wesentliche „Eckpunkte“ der Entwicklung von definitiven HSZ (dHSZ) im Embryo untersuchen zu können, wurden geeignete Reporter- und *knock-out* ESZ eingesetzt. Die Spezifikation des Mesoderms wurde mit Hilfe einer *Brachyury*^{GFP/+} ESZ-Linie über die Expression des TF Brachyury (Bry) analysiert. Die Expression und der Anteil von *Bry*⁺ mesodermalen Zellen, wurde durch die ektopy Expression von HOXB4 nicht beeinflusst. Auch am zeitlich nächsten definierten "Meilenstein" der hämatopoetischen Entwicklung, dem bipotenten Hämangioblasten (*Blast-Colony Forming Cell*, Bl-CFC), der sich weiter zu strukturellem oder hämogenem Endothel spezifizieren kann, führte HOXB4 zu keiner wesentlichen Änderung der Blastenkolonie-Zahlen. Allerdings vermittelte der TF eine sehr starke Zunahme von hämogenen Endothelzellen (HE) in den Blastenkolonien. Dieses nur transient vorkommende Endothel wandelt sich über den Prozess der *Endothelial-to-Hematopoietic Transition* (EHT) in dHSZ um. Für diesen Vorgang ist der TF Runx1 (AML1) essentiell. Durch den Einsatz einer *Runx1 knock-out* ESZ-Linie, die eine Doxyzyklin-induzierbare *Runx1* Kodierungssequenz im Genom integriert hat (*iRunx1*^{-/-}), konnte der Einfluss von HOXB4 auf die Entwicklung des HEs detailliert untersucht werden, da ohne Runx1 keine EHT zu dHSZ stattfindet. Ektop exprimiertes HOXB4 führte zu einer über 30-fachen Steigerung der Zahl an Endothel-Kolonien, die immunphänotypisch und funktionell als HE definiert

werden konnten. Zur genaueren Untersuchung des Prozesses der EHT wurde eine ESZ-Linie verwendet, die heterozygot Venus als Reportergen unter der Kontrolle des proximalen P2 Promotors von *Runx1* exprimiert (*Runx1*^{Venus/+}). HOXB4 induzierte zwar nicht die initiale basale Expression von *Runx1*, forcierte aber in einem Teil der HE-Zellen eine Steigerung der *Runx1* Expression über einen kritischen Schwellenwert, der für die Transition des hämogenen Endothels zu dHSZ notwendig war.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die ektopische Expression von HOXB4 in differenzierenden pluripotenten Stammzellen der Maus zu allererst in Hämangioblasten als „molekularer Schalter“ wirkt, indem es die hämatopoetische Spezifikation forciert. Die darauffolgende Steigerung der Expression von *Runx1* und dessen synergistisches Zusammenspiel mit HOXB4 führen letztendlich zu einer verstärkten Entstehung und Ausreifung von dHSZ.

Falls die Ergebnisse dieser Arbeit auf pluripotente Stammzellen des Menschen übertragbar sind, könnten sie eventuell zur künftigen Entwicklung von transplantierbaren, patientenspezifischen HSZ aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) wesentlich beitragen.

6. Summary

Identifying the molecular pathways regulating hematopoietic stem cell (HSC) specification from pluripotent stem cells, *in vitro*, is an important goal for the development of safe somatic gene and cell therapy. So far, HSCs capable of long-term multilineage reconstitution in mice have only been obtained when the homeodomain transcription factor (TF) HOXB4 was ectopically expressed during pluripotent stem cell differentiation. However, the primary "target" cell of HOXB4 responsible for enhanced hematopoietic development, *in vitro*, is not yet known. To pin down this cell, we retrovirally expressed HOXB4 or a Tamoxifen-inducible fusion protein containing the hormone-binding domain of the estrogen receptor in different reporter and knock-out mouse embryonic stem cells (ESCs) to investigate its influence on major fate decisions during different stages of hematopoietic specification, *in vitro*. To follow mesoderm specification, we used an ESC-line containing the CDS for green fluorescent protein (eGFP) integrated into the brachyury gene locus (*Bry*^{GFP/+}). *Bry* expression can be detected in all nascent and migrating mesoderm. Ectopic expression of HOXB4 did not influence the expression-level of *Bry* or the proportion of *Bry*⁺ cells. Likewise, development of the chronologically next cell-type known to be involved in hematopoietic development, the hemangioblast (blast-colony forming cell, BI-CFC) a bipotent cell capable of generating both structural and hemogenic endothelial cells was not altered by ectopic HOXB4 expression. However, HOXB4 mediated a strong, significant increase in the number of hemogenic endothelium (HE-) cells, a rare, temporary population of endothelial cells which develop from hemangioblasts. Definitive HSCs (dHSCs) arise from the HE by a process called *endothelial-to-hematopoietic-cell-transition* (EHT) which totally depends on the presence of the transcription factor Runx1. Utilizing a *Runx1* knock-out ESC-line containing a doxycycline-inducible *Runx1* coding sequence (*iRunx1*^{-/-}), we were able to investigate the influence of HOXB4 on the formation of the HE as dHSCs are not generated without Runx1. Ectopic HOXB4 expression mediated an approximately 30-fold increase in the number of circular endothelial sheets which immunphenotypically and functionally were proven to possess HE characteristics. To be able to follow the process of EHT in more detail, we employed ESCs containing a Venus gene reporter under the control of the proximal P2 promoter of one *Runx1* allele (*Runx1*^{Venus/+}). Although HOXB4 did not induce initial *Runx1* expression, it did promote the appearance of a subpopulation expressing increased levels of *Runx1* required for the transition of HE-cells towards dHSCs.

Taken together, our results strongly suggest that HOXB4 behaves as a “molecular switch” within the hemangioblast by enforcing its hematopoietic specification. The subsequent further increase of basal Runx1 expression and its synergistic activity with HOXB4 leads to the enhanced development and maturation of dHSCs. My results may hold promise to overcome the current limitations in generating transplantable HSCs from human pluripotent stem cells, such as iPSCs.

7. Literaturverzeichnis

- Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S. and Morgan, R. (2013).** The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, **27**, 1000-1008.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K. (2001).** HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Experimental Hematology*, **29**, 1125-1134.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K. (2002).** HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, **109**, 39-45.
- Argiropoulos, B. and Humphries, R. K. (2007).** Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*, **26**, 6766-6776.
- Azcoitia, V., Aracil, M., Martinez, A. C. and Torres, M. (2005).** The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev Biol*, **280**, 307-320.
- Baron, M. H. (2005).** Early patterning of the mouse embryo: implications for hematopoietic commitment and differentiation. *Exp Hematol*, **33**, 1015-1020.
- Baron, M. H., Isern, J. and Fraser, S. T. (2012).** The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood*, **119**, 4828-4837.
- Bertrand, J. Y., Chi, N. C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D. Y. and Traver, D. (2010).** Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*, **464**, 108-111.
- Bigas, A., Robert-Moreno, A. and Espinosa, L. (2010).** The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol*, **54**, 1175-1188.
- Bjornsson, J. M., Larsson, N., Brun, A. C., Magnusson, M., Andersson, E., Lundstrom, P., Larsson, J., Repetowska, E., Ehinger, M., Humphries, R. K. and Karlsson, S. (2003).** Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Mol Cell Biol*, **23**, 3872-3883.
- Boisset, J. C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E. and Robin, C. (2010).** In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, **464**, 116-120.
- Bronson, S. K., Plaehn, E. G., Kluckman, K. D., Hagaman, J. R., Maeda, N. and Smithies, O. (1996).** Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9067-9072.
- Burns, C. E., Traver, D., Mayhall, E., Shepard, J. L. and Zon, L. I. (2005).** Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev*, **19**, 2331-2342.
- Cai, Z., de Bruijn, M., Ma, X., Dortland, B., Luteijn, T., Downing, R. J. and Dzierzak, E. (2000).** Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity*, **13**, 423-431.

- Chan, K. M., Bonde, S., Klump, H. and Zavazava, N. (2008).** Hematopoiesis and immunity of HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **111**, 2953-2961.
- Chen, M. J., Yokomizo, T., Zeigler, B. M., Dzierzak, E. and Speck, N. A. (2009).** Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*, **457**, 887-891.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C. and Keller, G. (1998).** A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, **125**, 725-732.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Ciruna, B. and Rossant, J. (2001).** FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*, **1**, 37-49.
- Clarke, R. L., Yzaguirre, A. D., Yashiro-Ohtani, Y., Bondue, A., Blanpain, C., Pear, W. S., Speck, N. A. and Keller, G. (2013).** The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol*, **15**, 502-510.
- Costa, G., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2012).** Origin of blood cells and HSC production in the embryo. *Trends Immunol*, **33**, 215-223.
- de Bruijn, M. F. T. R., Speck, N. A., Peeters, M. C. E. and Dzierzak, E. (2000).** Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo Journal*, **19**, 2465-2474.
- Del Amo, F. F., Smith, D. E., Swiatek, P. J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R. J., McMahon, A. P. and Gridley, T. (1992).** Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development*, **115**, 737-744.
- Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., Daugherty, C., Ornitz, D. M. and Leder, P. (1994).** Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev*, **8**, 3045-3057.
- Dieterlen-Lievre, F. (1975).** On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol*, **33**, 607-619.
- Dieterlen-Lievre, F. and Martin, C. (1981).** Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev Biol*, **88**, 180-191.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. and Kemler, R. (1985).** The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, **87**, 27-45.
- Donello, J. E., Loeb, J. E. and Hope, T. J. (1998).** Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*, **72**, 5085-5092.
- Drake, C. J., Brandt, S. J., Trusk, T. C. and Little, C. D. (1997).** TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol*, **192**, 17-30.

- Dzierzak, E. and Speck, N. A. (2008).** Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, **9**, 129-136.
- Eilken, H. M., Nishikawa, S. and Schroeder, T. (2009).** Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature*, **457**, 896-900.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W. J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W. L., Orkin, S., Choi, K. and Rossant, J. (2003).** Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev*, **17**, 380-393.
- Emmel, V. E. (1915).** The cell clusters in the dorsal aorta of mammalian embryos. *The american journal of anatomy*, **19**, 20.
- Endoh, M., Ogawa, M., Orkin, S. and Nishikawa, S. (2002).** SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J*, **21**, 6700-6708.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**, 154-156.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C. X., Porcher, C., Orkin, S. and Choi, K. (2000).** Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development*, **127**, 1931-1941.
- Fan, R., Bonde, S., Gao, P., Sotomayor, B., Chen, C., Mouw, T., Zavazava, N. and Tan, K. (2012).** Dynamic HoxB4-regulatory network during embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells. *Blood*, **119**, e139-147.
- Fehling, H. J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G. and Kouskoff, V. (2003).** Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development*, **130**, 4217-4227.
- Ferkowicz, M. J., Starr, M., Xie, X., Li, W., Johnson, S. A., Shelley, W. C., Morrison, P. R. and Yoder, M. C. (2003).** CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development*, **130**, 4393-4403.
- Gehring, W. J. (1985).** The homeo box: a key to the understanding of development? *Cell*, **40**, 3-5.
- Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S. H. and Mikkola, H. K. (2005).** The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, **8**, 365-375.
- Gering, M., Yamada, Y., Rabbitts, T. H. and Patient, R. K. (2003).** Lmo2 and Scl/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development*, **130**, 6187-6199.
- Ghozi, M. C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D. and Groner, Y. (1996).** Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1935-1940.
- Golub, R. and Cumano, A. (2013).** Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis*, **51**, 226-231.
- Harrison, M. M., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M. and Wildonger, J. (2014).** A CRISPR view of development. *Genes Dev*, **28**, 1859-1872.

- Helgason, C. D., Sauvageau, G., Lawrence, H. J., Largman, C. and Humphries, R. K. (1996).** Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood*, **87**, 2740-2749.
- Herrmann, B. G. (1991).** Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development*, **113**, 913-917.
- Hildinger, M., Eckert, H. G., Schilz, A. J., John, J., Ostertag, W. and Baum, C. (1998).** FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Ther*, **5**, 1575-1579.
- Hills, D., Gribi, R., Ure, J., Buza-Vidas, N., Luc, S., Jacobsen, S. E. and Medvinsky, A. (2011).** Hoxb4-YFP reporter mouse model: a novel tool for tracking HSC development and studying the role of Hoxb4 in hematopoiesis. *Blood*, **117**, 3521-3528.
- Hirai, H., Samokhvalov, I. M., Fujimoto, T., Nishikawa, S., Imanishi, J. and Nishikawa, S. (2005).** Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. *Blood*, **106**, 1948-1955.
- Hirashima, M., Kataoka, H., Nishikawa, S., Matsuyoshi, N. and Nishikawa, S. (1999).** Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. *Blood*, **93**, 1253-1263.
- Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J. and Keller, G. (2004).** Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*, **432**, 625-630.
- Iacovino, M., Chong, D., Szatmari, I., Hartweck, L., Rux, D., Caprioli, A., Cleaver, O. and Kyba, M. (2011).** HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol*, **13**, 72-78.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. and Dieterlen-Lievre, F. (1998).** Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, **125**, 4575-4583.
- Johnson, G. R. and Moore, M. A. (1975).** Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature*, **258**, 726-728.
- Keller, G. (2005).** Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, **19**, 1129-1155.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. and Wiles, M. V. (1993).** Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*, **13**, 473-486.
- Kent, D. G., Copley, M. R., Benz, C., Wohrer, S., Dykstra, B. J., Ma, E., Cheyne, J., Zhao, Y., Bowie, M. B., Zhao, Y., Gasparetto, M., Delaney, A., Smith, C., Marra, M. and Eaves, C. J. (2009).** Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood*, **113**, 6342-6350.
- Kieusseian, A., Brunet de la Grange, P., Burlen-Defranoux, O., Godin, I. and Cumano, A. (2012).** Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. *Development*, **139**, 3521-3530.
- Kim, P. G., Albacker, C. E., Lu, Y. F., Jang, I. H., Lim, Y., Heffner, G. C., Arora, N., Bowman, T. V., Lin, M. I., Lensch, M. W., De Los Angeles, A., Zon, L. I., Loewer, S. and Daley, G. Q. (2013).**

Signaling axis involving Hedgehog, Notch, and Scl promotes the embryonic endothelial-to-hematopoietic transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E141-150.

Kispert, A. and Herrmann, B. G. (1994). Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev Biol*, **161**, 179-193.

Kissa, K. and Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, **464**, 112-115.

Klump, H., Schiedlmeier, B. and Baum, C. (2005). Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold. *Ann N Y Acad Sci*, **1044**, 6-15.

Klump, H., Schiedlmeier, B., Vogt, B., Ryan, M., Ostertag, W. and Baum, C. (2001). Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy. *Gene Ther*, **8**, 811-817.

Kodama, H., Nose, M., Niida, S., Nishikawa, S. and Nishikawa, S. (1994). Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol*, **22**, 979-984.

Kumano, K., Chiba, S., Kunisato, A., Sata, M., Saito, T., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., Masuda, S., Shimizu, K., Takahashi, T., Ogawa, S., Hamada, Y. and Hirai, H. (2003). Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity*, **18**, 699-711.

Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A. M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J. and Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*, **129**, 4891-4899.

Kyba, M., Perlingeiro, R. C. and Daley, G. Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, **109**, 29-37.

Lancrin, C., Mazan, M., Stefanska, M., Patel, R., Lichtinger, M., Costa, G., Vargel, O., Wilson, N. K., Moroy, T., Bonifer, C., Gottgens, B., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2012). GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood*, **120**, 314-322.

Lancrin, C., Sroczynska, P., Serrano, A. G., Gandillet, A., Ferreras, C., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2010). Blood cell generation from the hemangioblast. *J Mol Med (Berl)*, **88**, 167-172.

Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*, **457**, 892-895.

Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A. and Weinstein, B. M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, **128**, 3675-3683.

Lee, C. Y., Vogeli, K. M., Kim, S. H., Chong, S. W., Jiang, Y. J., Stainier, D. Y. and Jin, S. W. (2009). Notch signaling functions as a cell-fate switch between the endothelial and hematopoietic lineages. *Curr Biol*, **19**, 1616-1622.

- Lesinski, D. A., Heinz, N., Pilat-Carotta, S., Rudolph, C., Jacobs, R., Schlegelberger, B., Klump, H. and Schiedlmeier, B. (2012).** Serum- and stromal cell-free hypoxic generation of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells in vitro, capable of multilineage repopulation of immunocompetent mice. *Stem Cells Transl Med*, **1**, 581-591.
- Li, Z., Lan, Y., He, W., Chen, D., Wang, J., Zhou, F., Wang, Y., Sun, H., Chen, X., Xu, C., Li, S., Pang, Y., Zhang, G., Yang, L., Zhu, L., Fan, M., Shang, A., Ju, Z., Luo, L., Ding, Y., Guo, W., Yuan, W., Yang, X. and Liu, B. (2012).** Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell*, **11**, 663-675.
- Liakhovitskaia, A., Rybtsov, S., Smith, T., Batsivari, A., Rybtsova, N., Rode, C., de Bruijn, M., Buchholz, F., Gordon-Keylock, S., Zhao, S. and Medvinsky, A. (2014).** Runx1 is required for progression of CD41+ embryonic precursors into HSCs but not prior to this. *Development*, **141**, 3319-3323.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992).** Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, **68**, 283-302.
- McKinney-Freeman, S. L., Naveiras, O., Yates, F., Loewer, S., Philitas, M., Curran, M., Park, P. J. and Daley, G. Q. (2009).** Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood*, **114**, 268-278.
- Medvinsky, A. and Dzierzak, E. (1996).** Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, **86**, 897-906.
- Medvinsky, A., Rybtsov, S. and Taoudi, S. (2011).** Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*, **138**, 1017-1031.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M. and Dzierzak, E. A. (1993).** An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature*, **364**, 64-67.
- Mikkola, H. K., Fujiwara, Y., Schlaeger, T. M., Traver, D. and Orkin, S. H. (2003).** Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood*, **101**, 508-516.
- Mikkola, H. K., Gekas, C., Orkin, S. H. and Dieterlen-Lievre, F. (2005).** Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol*, **33**, 1048-1054.
- Moore, K. A., Ema, H. and Lemischka, I. R. (1997).** In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*, **89**, 4337-4347.
- Moore, M. A. and Metcalf, D. (1970).** Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol*, **18**, 279-296.
- Mukouyama, Y., Chiba, N., Hara, T., Okada, H., Ito, Y., Kanamaru, R., Miyajima, A., Satake, M. and Watanabe, T. (2000).** The AML1 transcription factor functions to develop and maintain hematogenic precursor cells in the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Dev Biol*, **220**, 27-36.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F. and Dzierzak, E. (1994).** Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, **1**, 291-301.
- Murray, P. D. F. (1932).** The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *Proc R Soc Lond B*, **111**, 497-520.

- Myers, C. T. and Krieg, P. A. (2013).** BMP-mediated specification of the erythroid lineage suppresses endothelial development in blood island precursors. *Blood*, **122**, 3929-3939.
- Nakano, H., Liu, X., Arshi, A., Nakashima, Y., van Handel, B., Sasidharan, R., Harmon, A. W., Shin, J. H., Schwartz, R. J., Conway, S. J., Harvey, R. P., Pashmforoush, M., Mikkola, H. K. and Nakano, A. (2013).** Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis. *Nat Commun*, **4**, 1564.
- Nakano, T. (1995).** Lymphohematopoietic development from embryonic stem cells in vitro. *Semin Immunol*, **7**, 197-203.
- Nakano, T. (1996).** In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis. *Int J Hematol*, **65**, 1-8.
- Nakano, T., Kodama, H. and Honjo, T. (1994).** Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, **265**, 1098-1101.
- Nakano, T., Kodama, H. and Honjo, T. (1996).** In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science*, **272**, 722-724.
- Nakazawa, F., Nagai, H., Shin, M. and Sheng, G. (2006).** Negative regulation of primitive hematopoiesis by the FGF signaling pathway. *Blood*, **108**, 3335-3343.
- Nishikawa, M., Tahara, T., Hinohara, A., Miyajima, A., Nakahata, T. and Shimosaka, A. (2001).** Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci*, **938**, 109-116.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N. and Kodama, H. (1998a).** Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, **125**, 1747-1757.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H. and Katsura, Y. (1998b).** In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity*, **8**, 761-769.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith, A. (1998).** Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, **12**, 2048-2060.
- North, T., Gu, T. L., Stacy, T., Wang, Q., Howard, L., Binder, M., Marin-Padilla, M. and Speck, N. A. (1999).** Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development*, **126**, 2563-2575.
- North, T. E., de Bruijn, M. F., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Binder, M., Dzierzak, E. and Speck, N. A. (2002).** Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity*, **16**, 661-672.
- Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B. and Bernstein, I. D. (2003).** Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*, **14**, 143-150.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. and Downing, J. R. (1996).** AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, **84**, 321-330.

- Ottersbach, K. and Dzierzak, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell*, **8**, 377-387.
- Padron-Barthe, L., Temino, S., Villa del Campo, C., Carramolino, L., Isern, J. and Torres, M. (2014). Clonal analysis identifies hemogenic endothelium as the source of the blood-endothelial common lineage in the mouse embryo. *Blood*, **124**, 2523-2532.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C. and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, **126**, 5073-5084.
- Palis, J. and Yoder, M. C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*, **29**, 927-936.
- Patterson, L. J., Gering, M., Eckfeldt, C. E., Green, A. R., Verfaillie, C. M., Ekker, S. C. and Patient, R. (2007). The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood*, **109**, 2389-2398.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pilat, S., Carotta, S. and Klump, H. (2013). Development of hematopoietic stem and progenitor cells from mouse embryonic stem cells, in vitro, supported by ectopic human HOXB4 expression. *Methods Mol Biol*, **1029**, 129-147.
- Pilat, S., Carotta, S., Schiedlmeier, B., Kamino, K., Mairhofer, A., Will, E., Modlich, U., Steinlein, P., Ostertag, W., Baum, C., Beug, H. and Klump, H. (2005). HOXB4 enforces equivalent fates of ES-cell-derived and adult hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12101-12106.
- Pimanda, J. E., Ottersbach, K., Knezevic, K., Kinston, S., Chan, W. Y., Wilson, N. K., Landry, J. R., Wood, A. D., Kolb-Kokocinski, A., Green, A. R., Tannahill, D., Lacaud, G., Kouskoff, V. and Gottgens, B. (2007). Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 17692-17697.
- Pineault, N., Helgason, C. D., Lawrence, H. J. and Humphries, R. K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol*, **30**, 49-57.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F. W. and Orkin, S. H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell*, **86**, 47-57.
- Pouget, C., Peterkin, T., Simoes, F. C., Lee, Y., Traver, D. and Patient, R. (2014). FGF signalling restricts haematopoietic stem cell specification via modulation of the BMP pathway. *Nat Commun*, **5**, 5588.
- Pozner, A., Lotem, J., Xiao, C., Goldenberg, D., Brenner, O., Negreanu, V., Levanon, D. and Groner, Y. (2007). Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis. *BMC Dev Biol*, **7**, 84.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. and Gardner, M. B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, **33**, 1027-1033.

- Ravasi, T., Suzuki, H., Cannistraci, C. V., Katayama, S., Bajic, V. B., Tan, K., Akalin, A., Schmeier, S., Kanamori-Katayama, M., Bertin, N., Carninci, P., Daub, C. O., Forrest, A. R., Gough, J., Grimmond, S., Han, J. H., Hashimoto, T., Hide, W., Hofmann, O., Kamburov, A., Kaur, M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Lassmann, T., van Nimwegen, E., MacPherson, C. R., Ogawa, C., Radovanovic, A., Schwartz, A., Teasdale, R. D., Tegner, J., Lenhard, B., Teichmann, S. A., Arakawa, T., Ninomiya, N., Murakami, K., Tagami, M., Fukuda, S., Imamura, K., Kai, C., Ishihara, R., Kitazume, Y., Kawai, J., Hume, D. A., Ideker, T. and Hayashizaki, Y. (2010). An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell*, **140**, 744-752.
- Rideout, W. M., 3rd, Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q. and Jaenisch, R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, **109**, 17-27.
- Robb, L., Elwood, N. J., Elefanty, A. G., Kontgen, F., Li, R., Barnett, L. D. and Begley, C. G. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J*, **15**, 4123-4129.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D. and Begley, C. G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7075-7079.
- Robert-Moreno, A., Espinosa, L., de la Pompa, J. L. and Bigas, A. (2005). RBPj κ -dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development*, **132**, 1117-1126.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. and Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature*, **323**, 445-448.
- Rowlinson, J. M. and Gering, M. (2010). Hey2 acts upstream of Notch in hematopoietic stem cell specification in zebrafish embryos. *Blood*, **116**, 2046-2056.
- Rybtsov, S., Sobiesiak, M., Taoudi, S., Souilhol, C., Senserrich, J., Liakhovitskaia, A., Ivanovs, A., Frampton, J., Zhao, S. and Medvinsky, A. (2011). Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region. *J Exp Med*, **208**, 1305-1315.
- Saravanamuthu, S. S., Gao, C. Y. and Zelenka, P. S. (2009). Notch signaling is required for lateral induction of Jagged1 during FGF-induced lens fiber differentiation. *Dev Biol*, **332**, 166-176.
- Sasaki, K., Yagi, H., Bronson, R. T., Tominaga, K., Matsunashi, T., Deguchi, K., Tani, Y., Kishimoto, T. and Komori, T. (1996). Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12359-12363.
- Sauvageau, G., Lansdorp, P. M., Eaves, C. J., Hogge, D. E., Dragowska, W. H., Reid, D. S., Largman, C., Lawrence, H. J. and Humphries, R. K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34⁺ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12223-12227.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C. J., Lawrence, H. J., Largman, C., Lansdorp, P. M. and Humphries, R. K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*, **9**, 1753-1765.

- Schiedlmeier, B., Klump, H., Will, E., Arman-Kalcek, G., Li, Z., Wang, Z., Rimek, A., Friel, J., Baum, C. and Ostertag, W. (2003). High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood*, **101**, 1759-1768.
- Schiedlmeier, B., Santos, A. C., Ribeiro, A., Moncaut, N., Lesinski, D., Auer, H., Kornacker, K., Ostertag, W., Baum, C., Mallo, M. and Klump, H. (2007). HOXB4's road map to stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16952-16957.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, **376**, 62-66.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L. and Orkin, S. H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*, **373**, 432-434.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, **336**, 688-690.
- Sroczynska, P., Lancrin, C., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2009). The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis. *Blood*, **114**, 5279-5289.
- Swiers, G., Baumann, C., O'Rourke, J., Giannoulatou, E., Taylor, S., Joshi, A., Moignard, V., Pina, C., Bee, T., Kokkaliaris, K. D., Yoshimoto, M., Yoder, M. C., Frampton, J., Schroeder, T., Enver, T., Gottgens, B. and de Bruijn, M. F. (2013a). Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level. *Nat Commun*, **4**, 2924.
- Swiers, G., de Bruijn, M. and Speck, N. A. (2010). Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1. *Int J Dev Biol*, **54**, 1151-1163.
- Swiers, G., Rode, C., Azzoni, E. and de Bruijn, M. F. (2013b). A short history of hemogenic endothelium. *Blood Cells Mol Dis*, **51**, 206-212.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
- Takeuchi, M., Sekiguchi, T., Hara, T., Kinoshita, T. and Miyajima, A. (2002). Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood*, **99**, 1190-1196.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H. S., Dieterlen-Lievre, F. and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, **87**, 67-72.
- Telfer, J. C. and Rothenberg, E. V. (2001). Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev Biol*, **229**, 363-382.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**, 1145-1147.

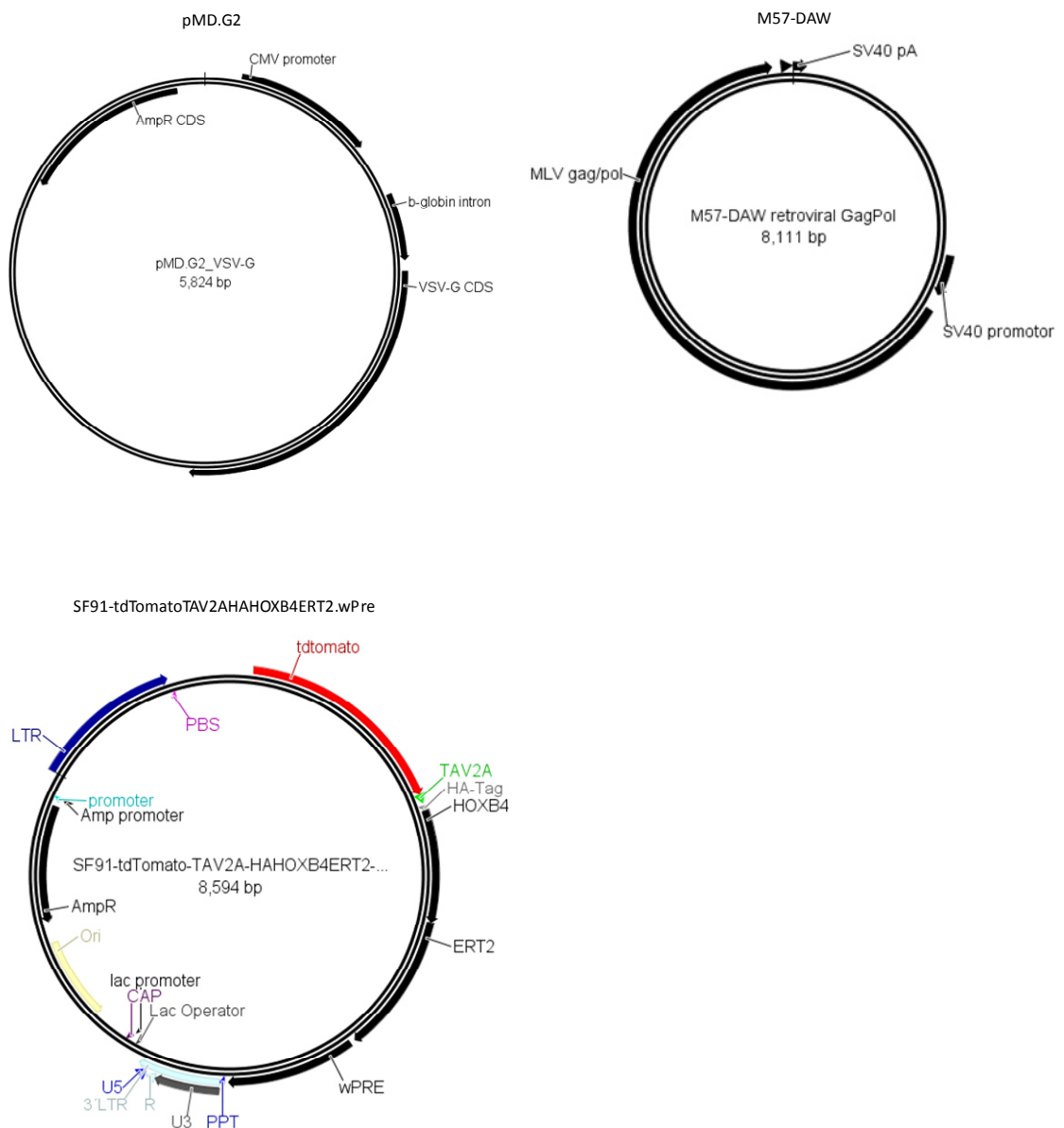
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G. and Humphries, R. K. (1999).** Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*, **94**, 2605-2612.
- Tober, J., Koniski, A., McGrath, K. E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K. K., Waugh, R. and Palis, J. (2007).** The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*, **109**, 1433-1441.
- Tober, J., Yzaguirre, A. D., Piwarzyk, E. and Speck, N. A. (2013).** Distinct temporal requirements for Runx1 in hematopoietic progenitors and stem cells. *Development*, **140**, 3765-3776.
- Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W. and Orkin, S. H. (1994).** An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, **371**, 221-226.
- Tung, J. W., Parks, D. R., Moore, W. A., Herzenberg, L. A. and Herzenberg, L. A. (2004).** New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol*, **110**, 277-283.
- Ueno, H. and Weissman, I. L. (2006).** Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell*, **11**, 519-533.
- Urness, L. D., Sorensen, L. K. and Li, D. Y. (2000).** Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*, **26**, 328-331.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D. and Kitajewski, J. (1996).** Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development*, **122**, 2251-2259.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0034.
- Vereide, D. T., Vickerman, V., Swanson, S. A., Chu, L. F., McIntosh, B. E. and Thomson, J. A. (2014).** An expandable, inducible hemangioblast state regulated by fibroblast growth factor. *Stem Cell Reports*, **3**, 1043-1057.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H. and Speck, N. A. (1996).** Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3444-3449.
- Webber, B. R., Iacovino, M., Choi, S. H., Tolar, J., Kyba, M. and Blazar, B. R. (2013).** DNA methylation of Runx1 regulatory regions correlates with transition from primitive to definitive hematopoietic potential in vitro and in vivo. *Blood*, **122**, 2978-2986.
- Wilkinson, H. A., Fitzgerald, K. and Greenwald, I. (1994).** Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision. *Cell*, **79**, 1187-1198.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Gough, N. M. (1988).** Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**, 684-687.

- Wilson, N. K., Foster, S. D., Wang, X., Knezevic, K., Schutte, J., Kaimakis, P., Chilarska, P. M., Kinston, S., Ouwehand, W. H., Dzierzak, E., Pimanda, J. E., de Bruijn, M. F. and Gottgens, B. (2010). Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell*, **7**, 532-544.
- Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M. and Rossant, J. (1994). *fgfr-1* is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev*, **8**, 3032-3044.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, **13**, 134.
- Yoder, M. C., Papaioannou, V. E., Breitfeld, P. P. and Williams, D. A. (1994). Murine yolk sac endoderm- and mesoderm-derived cell lines support in vitro growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood*, **83**, 2436-2443.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D. and Nishikawa, S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, **345**, 442-444.
- Zovein, A. C., Hofmann, J. J., Lynch, M., French, W. J., Turlo, K. A., Yang, Y., Becker, M. S., Zanetta, L., Dejana, E., Gasson, J. C., Tallquist, M. D. and Iruela-Arispe, M. L. (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, **3**, 625-636.

8. Anhang

Für die Verwendung FMEV-HOXB4 basierter Vektorplasmide ist als repräsentatives Beispiel das SF91-tdTomatoHOXB4ERT2 Plasmid aufgeführt.

8.1. Plasmidkarten



Abk: 2A: Esterasesequenz; **ampR**: Ampicillin Resistenz; **CMV**: Promotor des Cytomegalievirus; **ERT2**: Estrogen receptor ligand-binding domain; **HA-Tag**: Hemagglutinin-Tag; **LTR**: Long terminal repeats; **ORI**: Origin of replication; **pA**: Polyadenylation signal; **PBS**: Primer binding side; **PPT**: Polypurin tract; **wPRE**: Woodchuck-posttranscriptional regulatory element

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Peter Horn, der mir ermöglicht hat diese Arbeit am Institut für Transfusionsmedizin zu bearbeiten und sich bereit erklärt hat, die Rolle des Erstprüfers zu übernehmen. Vielen Dank auch dafür, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, an vielen nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen, welche diese Arbeit maßgeblich beeinflusst haben.

Desweiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Hannes Klump, für seine lehrreiche Betreuung und für die Unterstützung bei der Bearbeitung dieses interessanten Forschungsthemas bedanken. Vielen Dank, dass Du mir die Möglichkeit gegeben hast dieses Thema zu bearbeiten und mich mit vielen hilfreichen Diskussionen immer wieder herausgefordert hast.

Weiterhin danke ich Dr. George Lacaud vom Cancer Research in Manchester, Prof. S.I. Nishikawa vom Riken Center for Dev. Biology in Japan und Dr. Jörg Fehling vom Universitätsklinikum in Ulm für die Bereitstellung der ESZ-Linien, die uns einen großen Schritt weitergebracht haben.

Ein großes Dankeschön geht an die AG Klump. Wir hatten so viele lustige Momente im Labor und auch außerhalb des Laboralltags, dass ich diese Zeit nicht missen möchte. Antje, Corinna, Kristin und Melanie: vielen lieben Dank für Eure Unterstützung, Motivation und schöne Zeit; es war super mit Euch von Anfang an zusammen die Mysterien des Laboralltags zu meistern. Vielen Dank auch an die neuen AG Klump Mitstreiter Anika, Hannah und Susanne für die Hilfsbereitschaft im Labor und die stetige Motivation. Lara möchte ich für die tolle und engagierte Zusammenarbeit danken. Du hast Dich in dem Jahr mit so viel Motivation durch das HE gekämpft, was nicht selbstverständlich ist. Danke auch für die netten Kaffeepläuschchen zwischendurch. Und hey, wir haben die Golden Gate Bridge gerockt.

Vielen Dank an Andre, Anna und Stefan, die mir den Einstieg ins FACS und die Mikroskopie ermöglicht haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke auch allen Mitgliedern der Abteilung, für die Hilfsbereitschaft, den Zusammenhalt und das angenehme Arbeitsklima. Ich habe mich von Anfang an immer wohl gefühlt.

Ganz herzlichen Dank an Aneta, Bettina, Corinna, Lara und Verena, die mich gerade in den letzten stressigen Wochen unterstützt und immer wieder aufgebaut haben. Danke für Eure Hilfe!!!

Vielen lieben Dank an Anika, Britta, Meike und Nadine. Ihr habt immer ein offenes Ohr und man kann so herrlich mit Euch relaxen, dass man neue Power für das ganze Jahr bekommt. Dankeschön für die vielen spaßigen Momente.

Aber auch allen anderen lieben Freunden und meiner Familie möchte ich danken, für Eure aufbauenden Worte, Geduld und Verständnis, wenn es mal wieder hieß: „Muss nur noch kurz die Zellen splitten, und gleich danach bin ich wieder da......“

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mich in jeder Hinsicht unterstützt und seit immer für mich da, gebt mir Stärke und Rückhalt. Es gibt nicht genug Worte, um Euch zu danken.

Mein größter Dank gilt meinem Partner Jarek für seine Unterstützung, Liebe und Geduld. Du hast mich zum Lachen gebracht, wenn mir nicht danach war. Ein einfaches >>DANKE<< reicht hier gar nicht aus.

Dankeschön an alle, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe. Manchmal sind es die kleinen Dinge untereinander, die einen den Tag versüßen. Danke!!!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „HOXB4-vermittelte Spezifikation des hämogenen Endothels während der Differenzierung pluripotenter Stammzellen, *in vitro*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nadine Teichweyde befürworte.

Essen, den _____

(Prof. Dr. med. Peter Horn)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

(Nadine Teichweyde)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

(Nadine Teichweyde)